

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

10/517309

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 décembre 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/001050 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/82, 9/02, 15/62

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de St-Petersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/001877

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 19 juin 2003 (19.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/07729 21 juin 2002 (21.06.2002) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENO-
PLANTE-VALOR [FR/FR]; 93, rue Henri Rochefort,
F-91025 Evry Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MI-
RAS, Stéphane [FR/FR]; 70ter, avenue Aristide Berges,
F-38190 Lancey (FR). SALVI, Daniel [FR/FR]; Le
Manguely, F-38210 Tullins (FR). ROLLAND, Norbert
[FR/FR]; 7, rue Victor Hugo, F-38120 Saint-Egrève
(FR). JOYARD, Jacques [FR/FR]; 10, allée de la Piat,
F-38240 Meylan (FR). FERRO, Myriam [FR/FR]; 116,
rue Charles Michels, F-38600 Fontaine (FR). GARIN,
Jérôme [FR/FR]; 6, clos de la Providence, F-38700
Corenc (FR). GRUNWALD, Didier [FR/FR]; 3, rue des
Brieux, F-38120 Saint-Egrève (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: PLASTIDIAL TARGETING PEPTIDE

(54) Titre : PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL

(57) Abstract: The invention relates to a non-cleavable, plastidial targeting polypeptide derived from a protein from the inner mem-
brane of plant chloroplasts. Said peptide is particularly suitable for importing proteins of interest in plasts.

(57) Abrégé : L'invention est relative à un polypeptide d'adressage plastidial non clivable, issu d'une protéine de la membrane
interne de chloroplastes végétaux. Ledit peptide est utilisable notamment pour importer des protéines d'intérêt dans des plastes.

PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL

La présente invention est relative à la production de protéines d'intérêt dans des végétaux, et notamment à leur adressage vers le compartiment plastidial.

5 Les plastes sont des organites intracellulaires des végétaux chlorophylliens (algues, mousses, et végétaux supérieurs). On distingue plusieurs types principaux de plastes, selon leur teneur en pigments, et la nature de ceux-ci : les amyloplastes, riches en amidon, les chloroplastes
10 dans lesquels les pigments principaux sont les chlorophylles, et les chromoplastes dont les pigments principaux sont des caroténoïdes. Ces trois catégories de plastes qui dérivent de précurseurs communs, les proplastides, ont une structure de base commune constituée par une double membrane emprisonnant
15 le stroma plastidial. Dans les chloroplastes, il existe un troisième système membranaire formant à l'intérieur du stroma des saccules dénommées thylakoïdes.

Outre leur rôle primordial dans la photosynthèse, les chloroplastes sont également impliqués dans des réactions
20 d'oxydoréduction, par exemple la réduction des nitrites en ammonium. Les plastes jouent également un rôle essentiel dans la biosynthèse et/ou le stockage de nombreuses molécules, parmi lesquelles on citera l'amidon, les lipides, les caroténoïdes, la plupart des acides aminés, des hormones
25 végétales (acide abscissique, précurseurs des gibbérellines, du jasmonate, etc.).

Bien que les plastes possèdent leur propre génome codant pour une partie de leurs protéines, une grande partie des enzymes intervenant dans les différentes fonctions
30 plastidiales sont codées par le génome nucléaire et importées dans les plastes.

Cette importation s'effectue par un mécanisme spécifique, qui a plus particulièrement été étudié dans le cas des chloroplastes (pour revue cf. CHEN et SCHNELL, Trends
35 Cell Biol. 9, 222-227, 1999 ; KEEGSTRA et CLINE, The Plant Cell 11, 557-570, 1999 ; SCHLEIFF et SOLL, Planta 211, 449-456, 2000 ; JACKSON-CONSTAN et KEEGSTRA, Plant Physiol. 125, 1567-1676, 2001). Ce mécanisme fait intervenir un système

d'import dans chacune des deux membranes plastidiales : dans la membrane externe, le complexe TOC (Translocon at Outer membrane of Chloroplast) qui comprend au moins trois protéines : Toc 86, 75 et 34 (KESSLER et al., Science 266, 1035-1039, 1994 ; PERRY et KEEGSTRA, Plant Cell 6, 93-105, 1994) ; dans la membrane interne, le complexe TIC (Translocon at Inner membrane of Chloroplast) qui comprend au moins quatre protéines : Tic 110, 55, 22 et 20 (KESSLER et BLOBEL, Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 7684-7689, 1996 ; LÜBECK et al., EMBO J. 15, 4230-4238, 1996 ; CALIEBE et al., EMBO J. 16, 7342-7350, 1997 ; KOURANOV et al., J. Cell Biol., 143, 991-1002, 1998), ainsi qu'une protéine chaperonne dans le stroma : ClpC (AKITA et al., J. Cell Biol. 136, 983-994, 1997 ; NIELSEN et al., EMBO J. 16, 935-946, 1997).

Un élément majeur de ce mécanisme est Toc75, qui est la protéine la plus abondante dans la membrane externe, et forme le pore central du canal de translocation situé dans cette membrane (SCHNELL et al., Science 266, 1007-1012, 1994 ; TRANEL et al., EMBO J. 14, 2436-2446, 1995). Toc75 interagit spécifiquement avec une séquence particulière, dénommée « peptide d'adressage » ou « peptide de transit », localisée à l'extrémité N-terminale des protéines importées dans les plastes (MA et al., J. Cell Biol. 134, 315-327, 1996).

De nombreux peptides d'adressage ont été identifiés dans les précurseurs des protéines adressées vers l'espace intermembranaire, la membrane interne, le stroma, et dans le cas des chloroplastes, vers la membrane du thylakoïde.

Parmi les protéines connues pour posséder un peptide d'adressage intraplastidial clivable, on citera notamment des protéines adressées à l'espace intermembranaire, (Tic22: KOURANOV et al., 1998, précédemment cité; KOURANOV et al., J. Biol. Chem. 274, 25181-25194, 1999), des protéines adressées à la membrane interne (TPT(Triose-Pi/Pi translocator) : BRINK et al., J. Biol. Chem. 270, 20808-20815, 1995), des protéines adressées au stroma (petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase (Rubisco) : DE CASTRO SILVA FILHO et al., Plant Mol. Biol. 30, 769-780, 1996; *anhydrase carbonique*), des protéines adressées à la membrane du thylakoïde (LHCP(light harvesting complex) : LAMPPA et al., J. Biol. Chem. 263, 14996-14999, 1988; *Cfo-II: ATPase subunit*) et à la lumière du thylakoïde (OEE1(Oxygen Evolving Element 1) : KO et CASHMORE, EMBO J. 8, 3187-3194, 1989).

Ces peptides d'adressage comprennent généralement entre 40 et 100 acides aminés, et possèdent pour la plupart d'entre eux, des caractéristiques communes : ils sont quasiment dépourvus d'acides aminés chargés négativement, tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine ou la glutamine ; leur région N-terminale est dépourvue d'acides aminés chargés, et d'acides aminés tels que la glycine ou la proline ; leur région centrale contient une proportion très élevée d'acides aminés basiques ou hydroxylés, tels que la sérine et la thréonine ; leur région C-terminale est riche en arginine et a la capacité de former une structure secondaire amphipathique, en feuillet bêta.

Dans le cas des protéines adressées vers la lumière du thylakoïde, le peptide d'adressage est bipartite et comprend des informations additionnelles pour traverser la membrane du thylakoïde (DE BOER et WEISBEEK, Biochim. Biophys. Acta. 1071, 221-253, 1991). Dans certains cas, ce peptide d'adressage bipartite peut aussi être retrouvé chez des protéines adressées vers la membrane du thylakoïde (KARNAUCHOV et al., J. Biol. Chem. 269, 32871-32878, 1994).

Dans tous les cas le peptide d'adressage est clivé après l'importation. Ce clivage est effectué par des protéases spécifiques; une protéase localisée dans le stroma (VANDERVERE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7177-7181, 1995), et une protéase localisée dans la lumière du thylakoïde (CHAAL et al., J. Biol. Chem. 273, 689-692, 1998) ont été décrites.

Les protéines adressées à la membrane externe ne comportent généralement pas de peptide signal clivable ; l'information d'adressage est contenue dans la protéine mature (CLINE et HENRY, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 12, 1-26,

1996) ; après leur synthèse dans le cytosol, ces protéines sont directement incorporées dans la membrane (VAN'T HOF et al, FEBS lett. 291, 350-354, 1991 et J. Biol. Chem. 268, 4037-4042, 1993 ; PINADUWAGE et BRUCE, J. Biol. Chem. 271, 32907-32915, 1996) par l'intermédiaire d'interactions, dont la nature demeure mal connue, avec la bicouche lipidique. La seule exception connue à ce jour concerne la protéine Toc75 ou (OEP75) dont l'adressage à la membrane externe nécessite la présence d'un peptide d'adressage N-terminal bipartite clivable (TRANDEL et al., 1995, précédemment cité; TRANDEL and KEEGSTRA, Plant Cell 8, 2093-2104, 1996).

Il est connu que l'utilisation des peptides d'adressage aux plastides est nécessaire pour introduire dans ceux-ci des protéines d'intérêt permettant d'agir sur diverses fonctions plastidiales notamment dans le but d'améliorer les caractéristiques de plantes d'intérêt agronomique, par exemple la biosynthèse des lipides, de l'amidon, des vitamines, des hormones ou des protéines par lesdites plantes, ou leur résistance aux maladies aux insectes ou aux herbicides. Par exemple, la Demande EP 189707 propose l'utilisation de peptides d'adressage clivables issus de précurseurs de protéines chloroplastiques, et en particulier du peptide d'adressage de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, pour importer une protéine d'intérêt dans des chloroplastes ; la Demande PCT WO 00/12732 propose l'utilisation de peptides d'adressage de différentes protéines plastidiales pour importer des protéines d'intérêt dans des plastides.

Les fonctions plastidiales pouvant être modifiées de la sorte, et les caractéristiques conférées par ces modifications sont très diverses.

A des fins d'illustration non-limitative, on peut citer :

- l'augmentation de la résistance aux herbicides, par expression du précurseur de l'acétolactate synthétase (ALS), (LEE et al. EMBO J., 7, 1241-1248, 1988) d'acétolactate synthétase mutée (PRESTON et POWLES, Heredity 88, 8-13, 2002) ; CHONG et CHOI, Biochem. Biophys. Res.

Commun. 279, 462-467, 2000), ou de la 3-énolpyruvylshikimate-5-phosphate synthétase (EPSP synthétase) (KLEE et al., Mol. Gen. Genet., 210, 437-442, 1987)

5 - l'augmentation de la résistance à différents stress, par expression de la zéaxanthine époxidase, (SEO et al., Trends Plant Sci., 7, 41-48, 2002), de la choline monooxygénase (SHEN et al., Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 17, 1-6, 2001), du produit du gène ERD1_ARATH (KIYOSUE et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 196, 1214-1220, 1993), de
10 la ferrochélatase (CHOW et al., J. Biol. Chem., 31, 272, 27565-27571, 1997), de l'omega-3 acide gras désaturase (IBA et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso, 39, 2803-2813, 1994; MURAKAMI et al., Science 21, 287(5452), 476-479, 2000), de la glutamine synthétase (FUENTES et al., J. Exp. Bot., 52, 1071-
15 1081, 2001)

- la modification du métabolisme des plastes, pour augmenter la capture d'énergie lumineuse, (GAUBIER et al., Mol. Gen. Genet., 1, 249, 58-64, 1995), les capacités de photosynthèse et de croissance, (MIYAGAWA et al., Nature
20 Biotech., 19, 965-969, 2001), la teneur en caroténoïdes (HUGUENEY et al., Eur. J. Biochem., 1, 209, 399-407, 1992 ; MANN et al., Nature Biotech., 18, 888-892, 2000), ou la teneur en différentes substances d'intérêt, telles que l'amidon (Demande PCT WO 00/11144), des acides aminés
25 essentiels (MUEHLBAUER et al., Plant Physiol., 106, 1303-1312, 1994), la provitamine A (RÖMER et al., Nature Biotech., 18, 666-669, 2000), des hormones (JOYARD et al., Plant Physiol. 118, 715-723, 1998), etc.

- la surexpression et l'adressage chloroplastique
30 de protéines utilisables à des fins de bioremédiation (détoxification ou dépollution des sols contaminés) telles que la ferritine, (LOBREAUX et al., Biochem. J., 15, 288(Pt 3), 931-939, 1992), les protéines de la famille des phytochélatines (CAZALE et CLEMENS, FEBS 507, 215-219, 2001 ;
35 TSUJI et al., BBRC 293, 653-659, 2002), etc.

Tous les peptides d'adressage intraplasmidial connus dans l'art antérieur permettent d'importer une protéine dans les plastes par l'intermédiaire des systèmes

membranaires d'import TOC et TIC, comme indiqué ci-dessus. Il a été constaté que l'utilisation de ces peptides pour l'adressage de protéines d'intérêt dans le chloroplaste pouvait, notamment dans les cas où la construction peptide d'adressage/protéine d'intérêt est placée sous contrôle d'un promoteur fort tel que le promoteur 35S, présenter l'inconvénient de saturer ces systèmes d'import, en entrant en compétition avec les protéines adressées naturellement au chloroplaste. Il en résulte des « fuites » se traduisant au bout de quelques jours par la présence de la protéine d'intérêt dans d'autres compartiments subcellulaires comme le cytoplasme.

Il serait souhaitable de disposer de peptides d'adressage intraplastidial, qui ne dépendraient pas du système d'import TOC/TIC, et permettraient donc d'éviter les inconvénients mentionnés ci-dessus.

Lors de travaux précédents visant à identifier, par une approche protéomique, des protéines de préparations de membranes de chloroplastes d'épinard, les Inventeurs ont identifié, entre autres, des peptides possédant une similitude de séquence importante avec une protéine putative de 41 kDa d'*Arabidopsis* (numéro d'accès TrEMBL Q9SV68) (SEIGNEURIN-BERNY et al., Plant. J. 19, 217-228, 1999; FERRO et al., Electrophoresis 21, 3517-3526, 2000).

En poursuivant leurs travaux afin de mieux caractériser la protéine d'*Arabidopsis*, et son homologue chez l'épinard, les Inventeurs ont constaté que, de manière surprenante, bien qu'il s'agisse de protéines synthétisées dans le cytoplasme et importées au niveau de la membrane interne du chloroplaste, leur importation s'effectuait sans clivage d'un peptide d'adressage ; en outre, l'analyse de séquences de ces protéines ne fait apparaître aucune séquence possédant les caractéristiques des peptides d'adressage plastidial connus.

Les protéines de la famille représentée par la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis*, et la protéine homologue d'épinard sont désignées ci-après sous la dénomination IE41

(IE pour Inner Envelope selon la nomenclature classiquement utilisée pour ce système membranaire).

La séquence de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ; la séquence de l'ADNc codant pour la protéine IE41 d'épinard est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2, et la séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:3.

Les Inventeurs ont recherché quelles étaient les régions des protéines IE41 impliquées dans leur adressage plastidial, et ont identifié une région de 41 acides aminés (résidus 60 à 100) essentielle à cet adressage.

La séquence de cette région est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 4 pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis*, et sous le numéro SEQ ID NO: 5 pour la protéine IE41 d'épinard.

Ils ont en outre constaté que lorsque des fragments d'IE41 contenant cette région étaient fusionnés à l'extrémité N-terminale d'une protéine hétérologue, la protéine recombinante résultant de cette fusion était adressée aux chloroplastes de manière similaire à la protéine IE41 entière.

La présente invention a pour objet un polypeptide d'adressage intraplastidial caractérisé en ce qu'il comprend :

- un domaine A constitué par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec l'un des polypeptides SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5 ;

et au moins un domaine choisi parmi :

- un domaine B situé à l'extrémité N-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 49 à 59, de préférence au moins les

acides aminés 39 à 59, avantageusement au moins les acides aminés 29 à 59, de manière tout à fait préférée au moins les acides aminés 19 à 59, et de manière particulièrement avantageuse au moins les acides aminés 9 à 59 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec ledit fragment ;

- un domaine C situé à l'extrémité C-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 101 à 111, de préférence au moins les acides aminés 101 à 121, avantageusement au moins les acides aminés 101 à 131, de manière tout à fait préférée au moins les acides aminés 101 à 141, et de manière particulièrement avantageuse au moins les acides aminés 101 à 151 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec ledit fragment.

Les pourcentages d'identité ou de similarité mentionnés ici sont déterminés à l'aide du logiciel BLASTp (ALTSCHUL et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402, 1997), en utilisant les paramètres par défaut.

Les domaines A, B, et/ou C définis ci-dessus peuvent provenir d'une même protéine IE41 ; ils peuvent également provenir de protéines IE41 d'origines différentes.

La présente invention a également pour objet tout polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un polypeptide d'adressage intraplastidial conforme à l'invention avec un polypeptide hétérologue. Ledit polypeptide hétérologue peut être n'importe quel polypeptide d'intérêt que l'on souhaite introduire dans les plastes. De préférence, le polypeptide d'adressage intraplastidial

conforme à l'invention est placé à l'extrémité N-terminale du peptide hétérologue. Il pourrait toutefois être également placé à l'intérieur de celui-ci, ou bien à son extrémité C-terminale.

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide d'adressage intra-plastidial conforme à l'invention pour l'importation d'une protéine d'intérêt dans des plastes, et avantageusement, pour l'adressage de ladite protéine à la membrane interne
10 plastidiale.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit polypeptide d'adressage intra-plastidial est utilisé pour l'importation de ladite protéine d'intérêt dans des chloroplastes.

15 En particulier, la présente invention a pour objet un procédé pour importer une protéine d'intérêt dans des plastes caractérisé en ce qu'il comprend l'expression, dans une cellule végétale contenant lesdits plastes, d'un polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un
20 polypeptide d'adressage intraplastidial conforme à l'invention avec un polypeptide hétérologue.

La présente invention a également pour objet :

- tout polynucléotide codant pour un polypeptide d'adressage intraplastidial ou pour un polypeptide chimérique
25 conforme à l'invention ;

- toute cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide conforme à l'invention placé sous contrôle de séquences appropriées de régulation de la transcription (notamment promoteur et terminateur de
30 transcription).

- tout vecteur recombinant résultant de l'insertion, dans un vecteur-hôte approprié, d'un polynucléotide ou d'une cassette d'expression conforme à l'invention.

35 La présente invention a aussi pour objet des cellules-hôtes hébergeant un polynucléotide, une cassette d'expression, ou un vecteur recombinant conforme à l'invention.

La présente invention englobe également des plantes transgéniques génétiquement transformées par un polynucléotide ou une cassette d'expression conforme à l'invention, ainsi que les descendants de ces plantes.

5 L'invention comprend également les cellules et tissus végétaux, ainsi que les organes ou parties de plantes, y compris feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, et/ou graines obtenues à partir de ces plantes.

10 Les techniques classiques de construction de vecteurs recombinants, de transformation de cellules ou d'organismes hôte, et de production de protéines recombinantes, sont utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention.

15 Le choix du vecteur-hôte, et des séquences de régulation de l'expression seront effectuées notamment en fonction de la méthode de transformation et de la plante hôte choisies, et/ou du type de cellule ou de tissu dans lequel on souhaite obtenir l'expression.

20 De très nombreux promoteurs utilisables pour l'expression dans des cellules végétales sont connus en eux-mêmes. A titre d'exemples, on peut choisir un promoteur constitutif, tel que le promoteur 35S du CaMV ou ses dérivés, ou le promoteur de l'actine ou de l'ubiquitine, etc. On peut également choisir un promoteur inductible ou bien un
25 promoteur tissu-spécifique, afin de n'effectuer l'adressage plastidial de la protéine d'intérêt qu'à certains stades du développement de la plante, dans certaines conditions environnementales, ou dans certains tissus-cibles.

30 Par exemple, si l'on souhaite obtenir préférentiellement un adressage de la protéine d'intérêt vers les chloroplastes, on exprimera un polypeptide chimérique conforme à l'invention sous contrôle d'un promoteur spécifique de tissus ou organes riches en plastes. A titre d'exemples, les promoteurs du virus de la Chlorelle régulant
35 l'expression du gène de l'adénine méthyltransférase (MITRA et HIGGINS, Plant Mol. Biol. 26, 85-93, 1994) ou celui du virus de la mosaïque du manioc (VERDAGUER et al., Plant Mol. Biol. 37, 1055-1067, 1998) s'expriment principalement dans les

tissus verts. Les éléments régulateurs du promoteur du gène 2A11 de la tomate permettent une expression spécifique dans les fruits (VAN HAAREN et HOUCK, Plant Mol. Biol. 17, 615-630, 1991), etc.

5 Des méthodes de transformation de cellules végétales ou de plantes entières sont bien connues en elles-mêmes : à titre d'exemples non-limitatifs, on citera la transformation de protoplastes en présence de polyéthylèneglycol, l'électroporation, l'utilisation d'un
10 canon à particules, la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire, ou la transformation par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*.

La présente invention peut être mise en œuvre dans les applications usuelles des peptides d'adressage aux
15 plastes, et notamment dans celles mentionnées plus haut, pour agir sur diverses fonctions plastidiales. Il s'agit, en particulier, de la modification de fonctions propres à la membrane interne de l'enveloppe, par exemple, les biosynthèses de pigments, de quinones, d'acides gras, de
20 vitamines et de précurseurs d'hormones végétales, mais aussi, l'import de tous les ions et métabolites vers le plaste.

Les caractéristiques des peptides d'adressage plastidial conformes à l'invention, qui sont très différentes de celles des peptides d'adressage plastidial connus
25 permettent de supposer que les peptides d'adressage conformes à l'invention utilisent un système d'import différent de celui impliquant les protéines TOC et TIC.

De ce fait, les protéines d'intérêt adressées aux plastes à l'aide d'un peptide d'adressage conforme à
30 l'invention n'entreraient pas en compétition avec les protéines naturellement adressées vers le plaste par l'intermédiaire du système TOC et TIC, et ne satureraient pas ce dernier. Ceci permettrait notamment d'éviter les fuites dans les autres compartiments subcellulaires, et de conserver
35 les protéines d'intérêt dans le chloroplaste, même après plusieurs jours d'expression. Ceci permettrait également d'adresser vers les plastes des protéines pour lesquelles l'import classique grâce à une séquence d'adressage clivable

en N-terminal et utilisant le système TIC/TOC, ne serait pas fonctionnel.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'obtention et la caractérisation de peptides d'adressage plastidial conformes à l'invention et leur mise en œuvre pour l'importation de protéines hétérologues dans les chloroplastes.

10 **EXEMPLE 1 : CARACTERISATION ET CLONAGE DE LA PROTEINE IE41 D'ARABIDOPSIS THALIANA**

Lors de travaux antérieurs visant à identifier les protéines les plus hydrophobes de préparations de membranes chloroplastiques d'épinard (SEIGNEURIN-BERNY et al., Plant. J., 19, p.217-228, 1999 ; FERRO et al., Electrophoresis, 21, 3517-3526, 2000), plusieurs peptides dérivant d'une protéine de 41 kDa présentant une forte similarité de séquence avec une protéine putative d'*Arabidopsis* (Numéro d'accès TrEMBL Q9SV68) ont été mis en évidence.

Cependant, l'analyse de la séquence primaire de cette protéine de 41 kDa à l'aide du programme TMPred (HOFMANN et STOFFEL, Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 347, 166, 1993), n'a pas permis de détecter de segments trans-membranaires pouvant assurer l'ancrage de la protéine dans une bicouche lipidique.

Pour confirmer la localisation de cette protéine dans l'enveloppe du chloroplaste, l'ADNc correspondant a été cloné et la protéine recombinante sur-exprimée chez *E. coli* afin d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine.

Expression chez *E. coli*

L'ADNc codant pour la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis* est obtenu par PCR, à partir d'une librairie d'ADNc d'*Arabidopsis*, en utilisant les amorces suivantes :

TCACATATGGCTGGAAACTCAATGCAC (SEQ ID NO : 10)

qui permet d'introduire un site de restriction *NdeI* (souligné) à l'extrémité 5' de l'ADNc ;

ATGGATCCAACGCTCTTATGGCTCGAC (SEQ ID NO : 11)

qui permet d'introduire un site de restriction *BamHI* (souligné) à l'extrémité 3' de l'ADNc.

5 Le fragment d'amplification est cloné dans le plasmide pBluescript KS⁻. L'insert est ensuite digéré par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI*, et inséré dans le vecteur d'expression pET-15b (NOVAGEN).

10 Le vecteur résultant permet l'expression d'une protéine recombinante ayant une extension polyhistidine (His-tag) à son extrémité N-terminale [(His-tag)-P41].

Ce vecteur est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli*, souche BLR(DE3).

15 Les bactéries recombinantes sont mises en culture dans 500 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline à 37°C. Quand la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de la culture d'*E. coli* atteint 0,6, on ajoute de l'IPTG (isopropyl-β-D-galactothiopyranoside) à une concentration finale de 1 mM, pour induire l'expression de la protéine de 41 kDa.

20 Après 3 heures de culture, les cellules sont centrifugées pendant 2 mn à 13 000 rpm (EPPENDORF 5415D).

Le culot est remis en suspension dans 20 ml de tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na Cl, 10 mM imidazole, pH 8) et les bactéries sont lysées par sonication (sonicateur OMRON, type STP.YM.220.VAC, 6x1 mn, 0°C).

25 Après sonication, l'extrait protéique total est analysé par SDS-PAGE 12%. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie (R-250, BIORAD).

Les résultats sont illustrés par la figure 1A :
Légende de la figure 1A :

30 pET-15b = bactéries transformées par le plasmide non recombinant (contrôle négatif)

pET-15b + insert = bactéries transformées par le plasmide recombinant

- = pas d'induction par IPTG

35 + = induction par IPTG

* = bande correspondant à la protéine de 41 kDa recombinante

Après induction par l'IPTG, la protéine recombinante est fortement exprimée dans les bactéries

transformées par le plasmide pET-15b comprenant l'insert d'ADNc d'*Arabidopsis*.

Solubilisation de la protéine recombinante

Le culot bactérien est mis en suspension dans
5 1 ml de tampon Tris/HCl 20 mM, pH 6,8 puis lysé par sonication (sonicateur OMRON, type STP.YM.220.VAC, 6x1 mn, 0°C).

Après sonication, une première centrifugation
(2 mn, 13 000 rpm) de l'extrait protéique total permet
10 d'isoler les protéines solubles du surnageant. Les protéines insolubles du culot sont mises en suspension dans 1 ml d'un tampon contenant du détergent (20 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5% Triton X-100). Une seconde centrifugation permet d'isoler les
15 protéines membranaires solubilisées par le Triton X-100. Les protéines non solubilisées sont remises en suspension dans 20 mM Tris/HCl, pH 6,8 et analysées. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE 12%, comme indiqué ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la figure 1B :

20 Légende de la figure 1B :

pET-15b = bactéries transformées par le plasmide non recombinant (contrôle négatif)

pET-15b + insert = bactéries transformées par le plasmide recombinant

25 S = protéines solubles

D = protéines solubilisées dans le Triton X-100

I = protéines non solubilisées dans le Triton X-100

* = bande correspondant à la protéine de 41 kDa recombinante

On note que la protéine recombinante (*) se
30 retrouve dans 2 fractions distinctes : une fraction hydrosoluble présente dans le cytosol d'*E. coli* et une fraction insoluble, qui n'est pas solubilisée par le Triton X-100, ce qui indique qu'elle est probablement agrégée sous forme de corps d'inclusion.

Purification de la protéine recombinante

La fraction soluble de la protéine (His.tag)-P41 recombinante est purifiée par chromatographie d'affinité.

Après centrifugation (10 mn à 6 000 rpm, EPPENDORF 5415D), le surnageant est déposé sur une colonne d'affinité « His-bind resin », (NOVAGEN) de 2,5 ml chargée avec 13 ml de tampon de charge (50 mM NiSO₄) et équilibrée par 5 ml de tampon d'équilibrage (20 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM imidazole, 0,5 M NaCl).

La colonne est lavée avec 2 volumes contenant 35 mM imidazole, et 2 volumes de tampon de lyse contenant 60 mM imidazole (L2). La protéine est éluée avec 6 volumes de tampon de lyse contenant 250 mM imidazole. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE 12% et révélées au bleu de Coomassie.

Les résultats sont illustrés par la figure 2.

Légende de la figure 2 :

C = culot bactérien dilué dans le tampon de lyse (10 µl)

S = protéines bactériennes solubles (10 µl)

P = protéines non fixées (10 µl)

L, L1, L2 = lavages avec le tampon de lyse (35 et 60 mM imidazole) (15 µl)

Elution = fraction éluée en présence de 250 mM imidazole.

Production d'anticorps polyclonaux

La protéine recombinante (His-tag)-P41 purifiée, est dessalée (colonne SEPHADEX G25) et stockée à -80°C.

Cette protéine recombinante est utilisée pour immuniser des lapins afin de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis*.

EXEMPLE 2 : LOCALISATION DE LA PROTEINE DE 41 KDA DANS LES CHLOROPLASTES

Lors de la procédure de purification, la protéine de 41 kDa se comporte comme une protéine hydrosoluble et faiblement hydrophobe, ce qui pose la question de son association effective avec l'enveloppe du chloroplaste.

Sa localisation sub-cellulaire a donc été vérifiée par analyse de différentes fractions chloroplastiques.

Des chloroplastes bruts sont obtenus à partir de 3-4 kg de feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea* L.) et sont

purifiés par centrifugation isopycnique sur gradient de Percoll (DOUCE et JOYARD, Methods in chloroplast Molecular Biology. Edelman, M., Hallick, R. and Chua, N.-H., eds. (Amsterdam : Elsevier Science Publishers BV), 239-256, 1982).

5 A ce stade, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 mM benzamidine et 0,5 mM acide amino caproïque) sont ajoutés afin d'empêcher toute dégradation protéique. Les chloroplastes purifiés sont lysés dans un milieu hypotonique, et les membranes de l'enveloppe sont purifiées à partir du
10 lysat par centrifugation sur gradient de sucrose (DOUCE ET JOYARD, 1982, précité). Des sous-fractions d'enveloppe respectivement enrichies en membranes externes et internes sont obtenues selon le protocole décrit par BLOCK et al. (J. Biol. Chem., 258, 13273-13280, 1983).

15 Toutes les étapes ci-dessus sont réalisées entre 0 et 5°C. Les fractions obtenues sont stockées en azote liquide dans 50 mM MOPS-NaOH, pH 7,8, en présence d'inhibiteurs de protéases (1 mM benzamidine et 0,5 mM acide amino caproïque).

20 Analyse des fractions chloroplastiques

Les analyses par SDS-PAGE des chloroplastes totaux, ou de leurs fractions membranes d'enveloppe, stroma, membranes des thylakoïdes ; 15 µg) ainsi que des sous-fractions d'enveloppe de chloroplastes (15 µg) sont
25 effectuées comme décrit par CHUA (Methods Enzymol., 69, 434-436, 1980). Les gels de résolution et de concentration (12-15% acrylamide), comme le tampon de migration, contiennent 0,1% de SDS. Les peptides sont révélés soit par le bleu de Coomassie (MANIATIS et al., Cold Spring Harbor Laboratory,
30 Cold Spring Harbor, NY, 1982) soit par le nitrate d'argent (MERRIL et al., Anal. Biochem., 110, 201-207, 1981).

Pour les analyses par Western blot, la protéine de 41 kDa est détectée en utilisant les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine recombinante d'*Arabidopsis*
35 produite comme décrit à l'exemple 1, marqués à la phosphatase alcaline.

Les résultats sont représentés sur la figure 3A.

Légende de la figure 3A :

C = protéines du chloroplaste

E = protéines des membranes d'enveloppe

S = protéines du stroma

T = protéines des membranes des thylakoïdes

5 Ces résultats montrent que la protéine de 41 kDa est associée uniquement avec l'enveloppe du chloroplaste et n'est pas détectée dans le stroma ni dans les thylakoïdes.

Les chloroplastes intacts purifiés sont dépourvus de protéines du cytosol qui peuvent contaminer la préparation
10 (DOUCE et JOYARD, 1980, précité). Toutefois, la protéine de 41 kDa pourrait interagir spécifiquement avec la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste et pourrait ainsi être co-purifiée avec les préparations d'enveloppe. Afin d'exclure cette possibilité, 20 µg d'enveloppe issue de chloroplastes
15 intacts sont traités avec la thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* (0, 20, 50 et 100 µg/ml) afin de digérer les polypeptides localisés sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe (JOYARD et al., J. Biol. Chem., 258, 10000-10006, 1983). A titre de contrôle, des protéines
20 d'enveloppe solubilisées subissent le même traitement protéolytique.

La présence de la protéine de 41 kDa est détectée par Western blot, comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont représentés dans les figures
25 3B et 3C.

Légende des figures 3B et 3C :

0 = absence de thermolysine

20 = thermolysine à 20 µg/ml

50 = thermolysine à 50 µg/ml

30 100 = thermolysine à 100 µg/ml

La protéine de 41 kDa n'est pas affectée par le traitement par la thermolysine (figure 3B), alors que le même traitement protéolytique réalisé sur des protéines d'enveloppe solubilisées montrent la sensibilité de la
35 protéine de 41 kDa au traitement par la thermolysine (figure 3C). Ce résultat exclut l'hypothèse selon laquelle la protéine de 41 kDa serait localisée sur la face externe de la membrane externe. De fait, la protéine de 41 kDa n'est pas

une protéine du cytosol contaminant les préparations d'enveloppe de chloroplaste.

Des sous-fractions d'enveloppe respectivement enrichies en membranes externes et internes sont utilisées pour préciser la sous-localisation de la protéine de 41 kDa au niveau de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. La nature de ces sous-fractions d'enveloppe a été confirmée par l'utilisation des marqueurs IE18 et OEP24, qui sont respectivement des protéines intrinsèques de la membrane interne et externe de l'enveloppe du chloroplaste. Les protéines IE18 et OEP24 sont détectées en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre chacune de ces protéines.

Les résultats sont représentés dans la figure 3D.

Légende de la figure 3D :

E = protéines des membranes de l'enveloppe

OM = protéines de la membrane externe

IM = protéines de la membrane interne

La protéine de 41 kDa se retrouve, comme la protéine IE18, uniquement dans les préparations d'enveloppes chloroplastiques enrichies en membrane interne.

L'ensemble des résultats représentés dans les figures 3A-3D montre que la protéine de 41 kDa est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste.

D'après la nomenclature classique, cette protéine de l'enveloppe interne, présentant une masse théorique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de 41 kDa, est dénommée IE41 (pour « Inner Envelope Protein of 41 kDa »).

Analyse des interactions entre la protéine IE41 et la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste

Pour analyser plus précisément le mode d'interaction de la protéine IE41 avec la membrane interne des chloroplastes, différentes hypothèses ont été testées :

1) La protéine IE41 serait une protéine soluble localisée dans l'espace intermembranaire situé entre les membranes externe et interne de l'enveloppe du chloroplaste. Cette protéine serait co-purifiée avec les préparations

d'enveloppe, et séquestrée dans les vésicules d'enveloppe. Dans ce cas la sonication des vésicules d'enveloppe permettrait la libération de IE41.

Pour tester cette première hypothèse, des
5 protéines d'enveloppe (500 µg) sont solubilisées dans 50 mM
MOPS, pH 7,8 (500 µl). Les vésicules d'enveloppe sont
soniquées pendant 10 sec puis centrifugées (20 mn à 72 000 g,
Beckman L2 65B, rotor SW28) afin de séparer les protéines
solubles et membranaires. Chaque fraction (20 µl) est
10 analysée par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et
Western blot.

Les résultats sont représentés dans la figure 4A.
Légende de la figure 4A :

- = pas de sonication
15 + = sonication
S = protéines solubles
I = protéines de membrane

Les analyses par SDS-PAGE et Western blot des
fractions d'enveloppe traitées montrent que la protéine IE41
20 n'est pas solubilisée après sonication des vésicules
d'enveloppe. Au contraire, les protéines majeures solubles du
stroma (RbcL) qui sont séquestrées dans les vésicules
d'enveloppe, et qui sont connues pour contaminer les
fractions d'enveloppe, sont solubilisées par ce traitement.
25 Ceci montre que la protéine IE41 n'est ni une protéine
soluble de l'espace intermembranaire, ni une protéine soluble
du stroma contaminant la fraction d'enveloppe purifiée.

2) La protéine IE41 peut être liée à la membrane
interne :

30 - par ancrage à la bicouche lipidique ou
insertion partielle dans celle-ci ; dans ce cas, seule
l'utilisation de détergent peut permettre la solubilisation
de la protéine IE41 ;

- par des interactions électrostatiques avec une
35 ou plusieurs protéines membranaires ou la surface polaire de
la bicouche lipidique dans ce cas, ces interactions peuvent
être rompues, et la protéine IE41 solubilisée, par un
traitement alcalin ou par de fortes concentrations salines.

Pour déterminer le type d'interactions impliquées dans la liaison de IE41 avec la membrane interne, les expérimentations suivantes ont été effectuées :

a) solubilisation par le Triton X-100 :

5 Des vésicules d'enveloppe (0,8 mg) sont diluées dans 1 ml de 50 mM MOPS, pH 7,8 contenant 0,05, 0,1 ou 0,2% (v/v) de Triton X-100. Après incubation pendant 30 mn à 4°C, le mélange est centrifugé pour séparer les protéines solubles et membranaires. Toutes les fractions (20 µl) sont analysées
10 par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et Western blot.

Les résultats sont illustrés par la figure 4C.

Légende de la figure 4C :

Mix = vésicules d'enveloppe purifiées

15 M = protéines membranaires d'enveloppe

S = protéines solubles d'enveloppe

Ces résultats montrent que la protéine IE41 peut être totalement solubilisée par des concentrations de Triton X-100 (0,2%), beaucoup plus faibles que celles (de l'ordre de
20 2%) qui sont nécessaires pour solubiliser les protéines intrinsèques.

b) solubilisation par traitement alcalin ou par traitement salin.

25 Des vésicules d'enveloppe purifiées (500 µg) sont incubées 30 mn à 4°C dans différents milieux (500 µl) :

1) 10 mM MOPS, pH 7,8 + 0,5 M NaCl ;

2) 10 mM MOPS, pH 7,8 + 0,5 M KI ;

3) 0,1 M Na₂CO₃, pH 11 ;

4) 0,1 N NaOH,

30 puis soniquées et centrifugées comme décrit ci-dessus afin de séparer les protéines solubles et membranaires.

Toutes les fractions sont analysées (20 µl) par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et Western blot
35 (détection avec les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine IE41 d'*Arabidopsis* (dilution 1/5 000) ou dirigés contre la protéine IE18 (dilution 1/5 000).

Les résultats sont représentés dans la figure 4B

Légende de la figure 4B :

+ = sonication (10 sec)

NaCl 0,5 M = traitement 1

KI 0,5 M = traitement 2

5 0,1 M Na₂CO₃, pH 11 = traitement 3

0,1 N NaOH = traitement 4

S = fraction de protéines solubles

I = fraction de protéines insolubles

10 Ces résultats montrent que la protéine IE41 est au moins en partie solubilisée par les traitements salins (KI, NaCl) ou alcalins modérés (Na₂CO₃), qui sont sans effet sur la protéine intrinsèque IE18, cette dernière ne pouvant être solubilisée que par un traitement alcalin fort (NaOH).

15 L'ensemble des résultats présentés dans les figures 4A, 4B et 4C indiquent que la protéine IE41 est une protéine extrinsèque dont la liaison à la membrane interne de l'enveloppe chloroplastique implique des interactions électrostatiques.

20 **EXEMPLE 3 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE IE41 D'EPINARD**

De façon surprenante, la protéine IE41 purifiée à partir de chloroplastes d'épinard et la protéine recombinante d'*Arabidopsis* présentent une taille similaire en SDS-PAGE et Western blot, ce qui évoque la possibilité que IE41 puisse
25 être adressée à la membrane interne de l'enveloppe sans nécessiter le clivage d'une séquence d'import N-terminale.

Pour tester cette hypothèse, la protéine IE41 présente dans l'enveloppe des chloroplastes d'épinards a été purifiée afin de la séquencer et de comparer sa séquence à
30 celle de l'ADNc correspondant.

Immunopurification de la protéine IE41 d'épinard

Des protéines d'enveloppe chloroplastique (1 mg) sont solubilisées dans 1 ml de tampon Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CHAPS 6 mM et centrifugées (20 mn, 72 000 g, Beckman
35 L2 65B, rotor SW28). Les protéines solubles sont incubées pendant 1 h à 4°C avec 33 µl de sérum polyclonal dirigé contre la protéine recombinante IE41 d'*Arabidopsis*. On ajoute alors 50 µg d'agarose-protéine A (BOEHRINGER) et le mélange

est incubé 3 h à 4°C. Après 3 lavages successifs par centrifugation (EPPENDORF 5415D, 12 000 rpm, 20 mn, 4°C) et remise en suspension du culot dans 1 ml de tampon de solubilisation (20 mM MOPS, 150 mM NaCl, 6 mM CHAPS, pH 7,8),
5 on ajoute un excès (50 µg) de protéine recombinante (His-tag)-IE41 dans 200 µl de tampon de solubilisation. Le mélange est incubé pendant 1 h à 4°C, et centrifugé pendant 20 mn à 12 000 rpm (EPPENDORF 5415D). Le surnageant est incubé pendant 1 h avec de la résine Ni-NTA (QIAGEN), précédemment
10 équilibrée dans le tampon de solubilisation, afin d'éliminer la majeure partie de la protéine recombinante (His-tag)-IE41.

Chaque fraction (20 µl) est analysée par SDS-PAGE 12% (révélation au nitrate d'argent) et Western blot (en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin anti-IE41
15 décrits à l'Exemple 1).

Les résultats sont représentés dans la figure 5.

Légende de la figure 5 :

A : analyse par SDS-PAGE ;

B : Western blot ;

20 Mix = protéines d'enveloppe solubilisées ;

C = protéines insolubles ;

S = protéine solubles ;

L1, L2, L3 = fractions récupérées au cours des 3 lavages successifs ;

25 E1 = fraction éliminée par incubation avec la résine Ni-NTA;

E2 = protéine IE41 d'épinard purifiée (So) + (His-tag)-IE41.

La fraction E2 comprenant la protéine IE41 naturelle d'épinard purifiée (So) demeure contaminée par la protéine (His-tag)-IE41 recombinante d'*Arabidopsis*.

30 La différence de taille entre ces deux protéines correspond à l'extension polyhistidine (His-tag) présente à l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante.

EXEMPLE 4 : OBTENTION DE L'ADNC CODANT POUR LA PROTEINE IE41 D'EPINARD.

35 Le séquençage partiel de la protéine IE41 d'épinard élue à partir du gel d'électrophorèse a permis d'obtenir 9 séquences peptidiques différentes. Ces séquences

ont été utilisées pour définir des amorces dégénérées qui ont permis d'isoler l'ADNc codant pour la protéine IE41.

La séquence complète de cet ADNc (SEQ ID NO: 2), ainsi que la séquence polypeptidique déduite (SEQ ID NO:3) sont représentées sur la figure 6. Le codon ATG d'initiation de la traduction est indiqué en caractères gras, et le codon stop TAA est souligné. Les 9 séquences peptidiques obtenues par séquençage direct de la protéine IE41 d'épinard sont surlignées en gris. La correspondance entre les peptides obtenus avec la séquence déduite de l'ADNc de la protéine IE41 d'épinard, en particulier au niveau de la région N-terminale, ainsi que la présence d'un codon stop en aval de la méthionine initiatrice et dans le même cadre de lecture, démontrent que l'ADNc prédit est complet et que cette protéine ne subit pas de maturation post-traductionnelle lors de son adressage à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste

La protéine IE41 d'épinard présente 75,1% d'identité et 88,8% de similarité avec la protéine IE41 d'*Arabidopsis*. Cette forte similarité, et le fait qu'*Arabidopsis* contient seulement un gène *ie41* par génome haploïde, permettent de conclure que ces protéines sont codées par des gènes d'*Arabidopsis* et d'épinard orthologues.

Les protéines IE41 d'*Arabidopsis* et d'épinard ont été alignées avec des protéines homologues de bactérie, de levure, et d'animaux.

Les résultats sont présentés sur la figure 7.

Arabidopsis thaliana : IE41 ATH (SEQ ID NO : 1),

Epinard : IE41 SOL (SEQ ID NO : 3) ;

protéines homologues :

Escherichia coli : QORECOLI (SEQ ID NO : 6),

Saccharomyces cerevisiae : QORYEAST (SEQ ID NO : 7),

Cavia Porcellus : QORCAVPO (SEQ ID NO : 8),

souris : QORMOUSE (SEQ ID NO : 9).

Les résidus conservés dans les 6 séquences peptidiques sont surlignés en gris foncé. Les résidus conservés dans la séquence de IE41 et dans au moins une autre séquence de protéine homologue sont surlignés en gris clair. Les

similarités entre résidus se basent sur les groupes suivants : ASPTG, ILMV, KRH, NQ, DE, YWF et C.

Les recherches d'homologies indiquent que la protéine IE41 appartient à la superfamille des deshydrogénases, et plus particulièrement au groupe des quinones oxydo-réductases de type ξ -crystalline (JÖRNVALL et al., FEBS 3, 240-244, 1993). De plus, la comparaison de séquence entre les protéines IE41 et les autres protéines de la même famille, révèle que les 50 premiers résidus dans la région N-terminale de ces protéines sont très conservés entre bactéries, végétaux, et animaux. Cette observation suggère que cette région N-terminale des protéines IE41 de végétaux ne serait pas impliquée dans l'adressage dans le chloroplaste, et serait conservée plus probablement du fait de la pression de sélection exercée au cours de l'évolution sur le domaine catalytique de la protéine.

EXEMPLE 5 : ANALYSE DE L'ADRESSAGE PLASTIDIAL DE LA PROTEINE IE41 D'ARABIDOPSIS DANS DES CELLULES D'ARABIDOPSIS ET DE TABAC

Pour définir le domaine essentiel à l'import de la protéine IE41, différentes constructions codant pour des formes tronquées de cette protéine fusionnées à la GFP sont exprimées dans les cellules d'*Arabidopsis* et de tabac.

Construction des vecteurs d'expression :

Le plasmide [35 Ω -sGFP(S65T)] utilisé pour ces constructions, qui comprend la séquence codant pour la GFP sous contrôle du promoteur 35S, ainsi que le plasmide [35 Ω -TP-sGFP(S65T)], qui comprend la séquence codant pour le peptide d'adressage (TP) de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, fusionnée à la séquence codant pour la GFP ont été décrits précédemment par CHIU et al. (Curr. Biol., 6, 325-330, 1996).

La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

XhoI-N-ter CCTCTCGAGATGGCTGGAAACTCATGCAC (SEQ ID NO : 12),
et

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13),

qui introduisent respectivement un site *XhoI* et un site *NcoI* (soulignés).

Le produit de PCR est cloné à bouts francs dans le vecteur PBLUESCRIPT KS (STRATAGENE). Le fragment *XhoI-NcoI* clivé du plasmide ainsi obtenu est inséré dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T) préalablement digéré par *SalI-NcoI* afin de créer le vecteur 35Ω-IE41-sGFP(S65T), comprenant la région codante de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* fusionnée à la GFP. Un protocole similaire est utilisé pour les autres constructions :

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 31 premiers acides aminés est obtenue par amplification PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

15 *SalI-N-ter* CGGTTGTCGACATGAAGAGTAATGAGGTTGCCTG (SEQ ID NO : 14)

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

Le plasmide 35Ω-Δ(1-31)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 59 premiers acides aminés est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

25 *SalI-N-ter* GAATGGTCGACATGTTTCTGCCCCGCAAGTTC (SEQ ID NO : 15),
et

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

Le plasmide 35Ω-Δ(1-59)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 99 premiers acides aminés est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

30 *SalI-N-ter* GGTGTCGACATGCTAGGTGGAGGTGGACTTG (SEQ ID NO : 16)

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

35 Le plasmide 35Ω-Δ(1-99)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour les acides aminés 6-100 de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

XhoI-N-ter CCTCTCGAGATGGCTGGAAAACTCATGCAC (SEQ ID NO : 17)

5 *NcoI*-C-ter ACCCATGGCTAGATGGCTAAGAACCGCTAC (SEQ ID NO : 18).

L'amorce SEQ ID NO : 17 comprend un nucléotide supplémentaire par rapport à l'amorce SEQ ID NO : 15, ce qui crée un décalage de la phase de lecture dans le produit d'amplification, dont la traduction débute au niveau du codon
10 ATG correspondant à la méthionine en position 6 de la protéine IE41.

Le plasmide 35 Ω -(6-100)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35 Ω -sGFP(S65T).

15 *La séquence codant pour les acides aminés 60-100 de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

SalI-N-ter GAATGGTCGACATGTTTCTGCCCCGCAAGTTC (SEQ ID NO : 15)

NcoI-C-ter ACCCATGGCTAGATGGCTAAGAACCGCTAC (SEQ ID NO : 18).

20 Le plasmide 35 Ω -(60-100)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35 Ω -sGFP(S65T).

Ces différentes constructions sont représentées sur la figure 8.

Légende de la figure 8 :

25 IE41=plasmide 35 Ω -IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-31)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-31)IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-59)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-59)IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-99)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-99)IE41-sGFP(S65T)

(6-100)IE41= plasmide 35 Ω -(6-100)IE41-sGFP(S65T)

30 (60-100)IE41= plasmide 35 Ω -(60-100)IE41-sGFP(S65T)

Bombardement de cellules d'*Arabidopsis* et de tabac

Les cellules d'*Arabidopsis* sont cultivées à la lumière pendant 3 jours dans du milieu B5 de GAMBORG (SIGMA, pH 5,8) complémenté avec 1,5% sucrose et 1 μ M ANA (acide
35 naphtalène acétique). 15 ml de suspension cellulaire (correspondant à environ 0,5 g) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu de croissance

additionné de 0,8% bacto-agar, et incubés pendant 18-36 h à la lumière.

Les cellules BY2 de tabac sont cultivées pendant 5 jours à 27°C dans du milieu de MURASHIGE et SKOOG (milieu MS, DUCHEFA, pH 5,8) complémenté avec 3% sucrose, 0,2% KH_2PO_4 , 0,2% myoinositol, 1 μM 2.4D (acide 2.4-dichlorophénoxyacétique) et 3 μM thiamine. 2,5 ml de suspension cellulaire (correspondant à environ 0,3 g) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu de croissance additionné de 1% bacto agar et sont placés à 27°C pendant 18-24 h.

Les plasmides comprenant les constructions à tester utilisés pour le bombardement tissulaire sont préparés en utilisant le « QIAfilter Plasmid Midi Kit » (Qiagen, Allemagne).

Le plasmide [35 Ω -sGFP(S65T)] (GFP) et le plasmide [35 Ω -TP-sGFP(S65T)] (TP-GFP) sont respectivement utilisés à titre de témoin négatif et de témoin positif.

Les plasmides (1 μg) sont introduits dans les cellules en utilisant un canon à particules pneumatique (PDS-1000/He, BIORAD). Les conditions de bombardement sont les suivantes : pression d'hélium de 1 350 psi ; disques de rupture de 1 100 psi (BIORAD) ; distance de cible de 10 cm ; des microporteurs en or de 1 μm (BIORAD) sont utilisés. Après le bombardement, les cellules sont incubées sur ces mêmes boîtes de Petri pendant 18-36 h (à la lumière pour les cellules d'*Arabidopsis*), puis transférées sur des lames en verre avant la microscopie de fluorescence.

Microscopie de fluorescence

La localisation de la GFP et des peptides de fusion à la GFP est analysée dans les cellules transformées par microscopie de fluorescence en utilisant un microscope à fluorescence ZEISS AXIOPLAN 2, et une caméra CCD digitale (HAMAMATSU). Les jeux de filtres utilisés sont : jeu de filtre Zeiss 13, 488013-0000 (excitateur BP 470/20, diviseur de faisceau FT 493, émetteur BP 505-530), et jeu de filtre Zeiss 15, 488015-0000 (excitateur BP 546/12, diviseur de

faisceau FT 580, émetteur LP 590) pour la GFP et l'auto-fluorescence des chlorophylles, respectivement.

Dans ces conditions, la présence de la chlorophylle (spécifiquement localisée au niveau des chloroplastes) et la localisation de la GFP dans la cellule sont visualisées par une fluorescence intense.

Dans les cellules d'*Arabidopsis* transformées avec les constructions GFP, $\Delta(1-99)$ IE41, et (60-100)IE41, la fluorescence de la GFP apparaît diffuse, et localisée au niveau du cytosol et du noyau; aucune co-localisation avec la chlorophylle n'est observée.

Dans les cellules d'*Arabidopsis*, transformées avec les constructions IE41, $\Delta(1-31)$ IE41, $\Delta(1-59)$ IE41, (6-100)IE41, ainsi qu'avec le témoin positif de localisation TP-GFP, on observe au contraire une co-localisation, au niveau des chloroplastes, entre la fluorescence de la GFP et l'autofluorescence de la chlorophylle.

Les résultats sont similaires dans les cellules non chlorophylliennes BY2 de tabac : les marquages fluorescents observés avec les constructions IE41, $\Delta(1-59)$ IE41 et (6-100)IE41, et avec le témoin positif de localisation TP-GFP, correspondent à une localisation plastidiale ; en revanche, les marquages fluorescents observés avec les constructions GFP, $\Delta(1-99)$ IE41, et (60-100)IE41 correspondent à une localisation cytosolique et nucléaire.

Ces expériences montrent que l'adressage est également efficace dans les plastes non chlorophylliens.

L'ensemble des résultats ci-dessus montre que :

- la protéine IE41 complète fusionnée à la GFP est adressée dans le chloroplaste ;
- les 59 résidus localisés en N-terminal ne sont pas essentiels à l'import ;
- les 99 résidus localisés en N-terminal contiennent une région essentielle à l'import ;
- une séquence de 94 résidus, correspondant aux acides aminés N-terminaux 6-100 est suffisante pour catalyser

l'import ; les 223 résidus (101-323) C-terminaux ne sont donc pas essentiels à l'import.

La séquence interne de 40 acides aminés, allant des résidus 60-100, correspond au domaine essentiel à l'import. Toutefois, ce domaine qui doit être présent pour diriger la protéine vers les plastides, n'est pas suffisant pour un bon adressage.

EXEMPLE 6 : ANALYSE IN PLANTA DE L'ADRESSAGE PLASTIDIAL DE LA PROTEINE IE41

Les plasmides 35 Ω -IE41-sGFP(S65T), 35 Ω - Δ (1-31)IE41-sGFP(S65T), 35 Ω - Δ (1-59)IE41-sGFP(S65T), 35 Ω - Δ (1-99)IE41-sGFP(S65T), 35 Ω -(6-100)IE41-sGFP(S65T), et 35 Ω -(60-100)IE41-sGFP(S65T), ainsi que les plasmides témoins 35 Ω -sGFP(S65T) et 35 Ω -TP-sGFP(S65T), ont été digérés par EcoRI/HindIII pour récupérer les cassettes d'expression.

Celles-ci ont été insérées dans le plasmide binaire pEL103 (dérivé du plasmide pBI121 (AF485783), contenant un gène de résistance à la kanamycine), et le plasmide résultant a été utilisé pour transformer la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation. Les bactéries transformées ont été utilisées pour transformer des plants d'*Arabidopsis* WS par la technique de « trempage floral » (The Plant Journal 1998; 16: 735-743). Les plantes transgéniques sont sélectionnées sur la base de leur résistance à la kanamycine.

Afin d'analyser l'expression des protéines de fusion dans les plantes transgéniques, les protéines totales sont extraites à partir de 10 mg de feuilles de chacune des plantes testées, et solubilisées dans le tampon suivant : pyrophosphate de tétrasodium (13,4 g/l), Tris-HCl pH 6,8 (50 mM), SDS (1 %).

L'extrait protéique est analysé par SDS-PAGE (12 % acrylamide), et par transfert de Western à l'aide d'un anticorps anti-GFP (anticorps 2A5 (Euromedex) au 1/4000^e dans TBST/lait 5 % ; anticorps secondaire: IgG anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/10000^e dans TBS-Triton), ou des anticorps polyclonaux de lapin anti-IE41 décrits à l'Exemple 1 (au 1/5000^e dans TBS-

Triton/lait 5% ; Anticorps secondaire IgG anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline (Promega) dilué au 1/10000^e dans du tampon TBS-Triton.

Les résultats de ces analyses sont illustrés par la Figure 9 ;

Légende de la Figure 9 :

- A : analyse par SDS-PAGE ;
- B : Transfert de Western avec l'anticorps anti-GFP : les flèches noires indiquent la présence de la protéine GFP dans les fusions exprimées chez *Arabidopsis* ;
- C : Transfert de Western avec un anticorps anti-IE41 : les flèches noires indiquent la présence de la protéine IE41 dans les fusions exprimées chez *Arabidopsis* ; le losange blanc indique la position de la protéine IE41 naturelle présente dans tous les extraits ;
- WT= plante non transformée ;
- M= marqueurs de poids moléculaire ;
- GFP= plasmide 35Ω-sGFP(S65T) ;
- TP GFP= plasmide 35Ω-TP-sGFP(S65T) ;
- IE41 GFP= plasmide 35Ω-IE41-sGFP(S65T) ;
- Δ(1-59)IE41 GFP= plasmide 35Ω-Δ(1-59)IE41-sGFP(S65T) ;
- Δ(1-99)IE41 GFP= plasmide 35Ω-Δ(1-99)IE41-sGFP(S65T) ;
- (6-100)IE41 GFP= plasmide 35Ω-(6-100)IE41-sGFP(S65T) ;
- (60-100)IE41 GFP= plasmide 35Ω-(60-100)IE41-sGFP(S65T).

Ces résultats montrent que les protéines de fusion sont exprimées dans toutes les plantes transformées.

La localisation subcellulaire des protéines exprimées par les différentes constructions a été visualisée en microscopie à fluorescence, comme décrit à l'Exemple 5 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la Figure 10 ;
Légende de la Figure 10 :

- GFP= plasmide 35Ω-sGFP(S65T) ;
- TP-RBCS GFP= plasmide 35Ω-TP-sGFP(S65T) ;
- IE41 GFP= plasmide 35Ω-IE41-sGFP(S65T) ;
- (6-100)IE41 GFP= plasmide 35Ω-(6-100)IE41-sGFP(S65T) ;

Il apparaît que, dans les conditions d'expression mises en oeuvre ci-dessus, c'est la région *N*-terminale de la protéine IE41 (résidus 6 à 100) qui confère la plus grande spécificité d'adressage vers le plaste. En effet la construction (6-100)IE41-GFP qui n'exprime que cette région, permet l'adressage systématique de la totalité de la fluorescence vers les plastides. Au contraire, la protéine IE41 complète (construction IE41-GFP) induit un adressage plastidial moins spécifique. Dans ces conditions, la protéine IE41 semble aussi adressée vers d'autres compartiments intracellulaires.

REVENDEICATIONS

1) Polypeptide d'adressage intraplastidial caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - un domaine A constitué par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité avec l'un des polypeptides SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5 ;

et au moins un domaine choisi parmi :

10 - un domaine B situé à l'extrémité N-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 49 à 59 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité, avec ledit fragment ;

15 - un domaine C situé à l'extrémité C-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 101 à 111 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 20 65% de similarité avec ledit fragment.

2) Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le domaine B est constitué par un fragment comprenant au moins les acides aminés 39 à 59 des polypeptides SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :3, ou bien par un 25 polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité, avec ledit fragment.

3) Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le domaine C est constitué par un fragment comprenant au moins les acides 30 aminés 101 à 121 des polypeptides SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :3, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité avec ledit fragment.

4) Polypeptide chimérique, comprenant un 35 polypeptide d'adressage intraplastidial selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 fusionné avec une protéine hétérologue.

5) Polypeptide chimérique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polypeptide d'adressage intraplastidial est placé à l'extrémité N-terminale de la protéine hétérologue.

5 6) Utilisation d'un polypeptide d'adressage intraplastidial selon la revendication 1 pour l'importation d'une protéine d'intérêt dans des plastes.

10 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polypeptide d'adressage intraplastidial est utilisé pour l'importation de ladite protéine d'intérêt dans des chloroplastes.

15 8) Procédé pour importer une protéine d'intérêt dans des plastes caractérisé en ce qu'il comprend l'expression, dans une cellule végétale contenant lesdits plastes, d'un polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un polypeptide d'adressage intraplastidial selon la revendication 1 avec ladite protéine d'intérêt.

9) Polynucléotide codant pour un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 5.

20 10) Cassette d'expression comprenant un polynucléotide selon la revendication 9 placé sous contrôle de séquences de régulation de la transcription.

25 11) Vecteur recombinant résultant de l'insertion d'un polynucléotide selon la revendication 9 ou d'une cassette d'expression selon la revendication 10, dans un vecteur-hôte.

12) Plante transgénique transformée par un polynucléotide selon la revendication 9 ou une cassette d'expression selon la revendication 10.

10/517309

<110> GENOPLANTE-VALOR

MIRAS, Stéphane

SALVI, Daniel

ROLLAND, Norbert

JOYARD, Jacques

FERRO, Myriam

GARIN, Jérôme

GRUNWALD, Didier

<120> PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL

<130> MJPbv1516/7

<150> FR 02 07729

<151> 2002-06-21

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Gly Lys Leu Met His Ala Leu Gln Tyr Asn Ser Tyr Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ala Ala Gly Leu Glu His Val Gln Val Pro Val Pro Thr Pro Lys

20 25 30

Ser Asn Glu Val Cys Leu Lys Leu Glu Ala Thr Ser Leu Asn Pro Val

35 40 45

Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly Met Ile Arg Pro Phe Leu Pro Arg Lys

50 55 60

Phe Pro Cys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Gly Glu Val Val Glu Val
65 70 75 80
Gly Ser Gly Val Lys Asn Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Val Ala Val
85 90 95
Leu Ser His Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ala Glu Phe Ala Val Ala Thr
100 105 110
Glu Lys Leu Thr Val Lys Arg Pro Gln Glu Val Gly Ala Ala Glu Ala
115 120 125
Ala Ala Leu Pro Val Ala Gly Leu Thr Ala Leu Gln Ala Leu Thr Asn
130 135 140
Pro Ala Gly Leu Lys Leu Asp Gly Thr Gly Lys Lys Ala Asn Ile Leu
145 150 155 160
Val Thr Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly His Tyr Ala Val Gln Leu Ala
165 170 175
Lys Leu Ala Asn Ala His Val Thr Ala Thr Cys Gly Ala Arg Asn Ile
180 185 190
Glu Phe Val Lys Ser Leu Gly Ala Asp Glu Val Leu Asp Tyr Lys Thr
195 200 205
Pro Glu Gly Ala Ala Leu Lys Ser Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Asp Ala
210 215 220
Val Val His Cys Ala Asn Gly Ile Pro Phe Ser Val Phe Glu Pro Asn
225 230 235 240
Leu Ser Glu Asn Gly Lys Val Ile Asp Ile Thr Pro Gly Pro Asn Ala
245 250 255
Met Trp Thr Tyr Ala Val Lys Lys Ile Thr Met Ser Lys Lys Gln Leu
260 265 270
Val Pro Leu Leu Leu Ile Pro Lys Ala Glu Asn Leu Glu Phe Met Val
275 280 285
Asn Leu Val Lys Glu Gly Lys Val Lys Thr Val Ile Asp Ser Lys His
290 295 300
Pro Leu Ser Lys Ala Glu Asp Ala Trp Ala Lys Ser Ile Asp Gly His
305 310 315 320
Ala Thr Gly Lys Ile Ile Val Glu Pro
325

<210> 2

<211> 1228

<212> DNA

<213> Spinacia oleracea

<400> 2

```
ccatcctaatac gactcact atagggctcg agcggcgcgc cgggcagggtc aaactgtggt 60
aagataatac agtaccatta ccactctgacg cgcaaattggc tgctaagcta atgcatgcga 120
ttcaatatc tggctatggt ggtggaactg atgctttaaa gcatgttgaa gttgctgttc 180
ctgatccaaa gtctgatgag ttattgctta aaattgagggc tgcaactttg aaccaattg 240
attggaagat tcagaagggt gtacttcgtc cctcttacc ccgcaagttc cctactatac 300
ctggaactga tgttgctggg gaggtagtc aggctggatc tgctgtaaat aggtttaaaa 360
ctgggtgaca agtcgtggcc gtgcttagtc atgctactgg ggggtgacta gctgaatatg 420
ccgtggcgaa ggagaacctg acagttgcta gaccaccaga agtatcagca gcagaagggtg 480
ctgccttacc tgttgctgcc ctacaggctc accaagctct caccagttt gccaacatca 540
agctcgatgg aagtggtgaa aggaagaaca tattgatcac ggctgcatca gggggtgtgg 600
gccactatgc ggtccagctg gcaaagctcg ggaacacgca tgtaacagca acatgtggag 660
cccgaacct agatttcgtg aaaggcttgg gtgccgatga ggttcttgac tacaaaacac 720
ctgaaggggc gtccttgaca agcccgtcag gaaagaaata tgactacgta gtccacgggtg 780
caagcggaat cccttggtcc accttgagc ccaatttgag tgaagcagggt aaggtaatag 840
atctgactcc tggcccaact gcaatgatga catttgcttg gaaaaagcta acattctcca 900
aaaagcagct ggtgcctctg cttttgatac caaagatccc caactttgaa tatgttggtga 960
atctggtaaa ggaaaagaag cttaaaacag tcatagactc taaacatccc ttgagtaaag 1020
gtgaagatgc ttggagtagg ataatgggtg gtcatgctac agggaagatt ataatcgagc 1080
cttgaataga aaatattgat gcagaccgc tatatattgc ttgaagggtta caaactttta 1140
agtttatagt acttgagttt tactttccta gttgtaaaca ttcaagtatt tcataatgtt 1200
atactttcct agtttcctcc aaaaaaaa 1228
```

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

<213> Spinacia oleracea

<400> 3

```
Met Ala Ala Lys Leu Met His Ala Ile Gln Tyr Ser Gly Tyr Gly Gly
1           5           10           15
Gly Thr Asp Ala Leu Lys His Val Glu Val Ala Val Pro Asp Pro Lys
           20           25           30
Ser Asp Glu Leu Leu Leu Lys Ile Glu Ala Ala Thr Leu Asn Pro Ile
           35           40           45
```

Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly Val Leu Arg Pro Leu Leu Pro Arg Lys
 50' 55 60
 Phe Pro Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ala Gly Glu Val Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Ala Val Asn Arg Phe Lys Thr Gly Asp Lys Val Val Ala Val
 85 90 95
 Leu Ser His Ala Thr Gly Gly Ala Leu Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys
 100 105 110
 Glu Asn Leu Thr Val Ala Arg Pro Pro Glu Val Ser Ala Ala Glu Gly
 115 120 125
 Ala Ala Leu Pro Val Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Leu Thr Gln
 130 135 140
 Phe Ala Asn Ile Lys Leu Asp Gly Ser Gly Glu Arg Lys Asn Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Thr Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly His Tyr Ala Val Gln Leu Ala
 165 170 175
 Lys Leu Gly Asn Thr His Val Thr Ala Thr Cys Gly Ala Arg Asn Leu
 180 185 190
 Asp Phe Val Lys Gly Leu Gly Ala Asp Glu Val Leu Asp Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Pro Glu Gly Ala Ser Leu Thr Ser Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Asp Tyr
 210 215 220
 Val Val His Gly Ala Ser Gly Ile Pro Trp Ser Thr Phe Glu Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Ser Glu Ala Gly Lys Val Ile Asp Leu Thr Pro Gly Pro Thr Ala
 245 250 255
 Met Met Thr Phe Ala Trp Lys Lys Leu Thr Phe Ser Lys Lys Gln Leu
 260 265 270
 Val Pro Leu Leu Leu Ile Pro Lys Ile Pro Asn Phe Glu Tyr Val Val
 275 280 285
 Asn Leu Val Lys Glu Lys Lys Leu Lys Thr Val Ile Asp Ser Lys His
 290 295 300
 Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asp Ala Trp Ser Arg Ile Met Gly Gly His
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Lys Ile Ile Ile Glu Pro
 325

<210> 4
<211> 61
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Leu Glu Ala Thr Ser Leu Asn Pro Val Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly
1 5 10 15
Met Ile Arg Pro Phe Leu Pro Arg Lys Phe Pro Cys Ile Pro Ala Thr
20 25 30
Asp Val Ala Gly Glu Val Val Glu Val Gly Ser Gly Val Lys Asn Phe
35 40 45
Lys Ala Gly Asp Lys Val Val Ala Val Leu Ser His Leu
50 55 60

<210> 5
<211> 61
<212> PRT
<213> Spinacia oleracea

<400> 5

Ile Glu Ala Ala Thr Leu Asn Pro Ile Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly
1 5 10 15
Val Leu Arg Pro Leu Leu Pro Arg Lys Phe Pro Thr Ile Pro Gly Thr
20 25 30
Asp Val Ala Gly Glu Val Val Gln Ala Gly Ser Ala Val Asn Arg Phe
35 40 45
Lys Thr Gly Asp Lys Val Val Ala Val Leu Ser His Ala
50 55 60

<210> 6
<211> 327
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 6

Met Ala Thr Arg Ile Glu Phe His Lys His Gly Gly Pro Glu Val Leu
1 5 10 15
Gln Ala Val Glu Phe Thr Pro Ala Asp Pro Ala Glu Asn Glu Ile Gln
20 25 30
Val Glu Asn Lys Ala Ile Gly Ile Asn Phe Ile Asp Thr Tyr Ile Arg
35 40 45
Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Gly Leu Gly Thr Glu
50 55 60
Ala Ala Gly Ile Val Ser Lys Val Gly Ser Gly Val Lys His Ile Lys
65 70 75 80
Ala Gly Asp Arg Val Val Tyr Ala Gln Ser Ala Leu Gly Ala Tyr Ser
85 90 95
Ser Val His Asn Ile Ile Ala Asp Lys Ala Ala Ile Leu Pro Ala Ala
100 105 110
Ile Ser Phe Glu Gln Ala Ala Ala Ser Phe Leu Lys Gly Leu Thr Val
115 120 125
Tyr Tyr Leu Leu Arg Lys Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Asp Glu Gln Phe
130 135 140
Leu Phe His Ala Ala Ala Gly Gly Val Gly Leu Ile Ala Cys Gln Trp
145 150 155 160
Ala Lys Ala Leu Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Val Gly Thr Ala Gln
165 170 175
Lys Ala Gln Ser Ala Leu Lys Ala Gly Ala Trp Gln Val Ile Asn Tyr
180 185 190
Arg Glu Glu Asp Leu Val Glu Arg Leu Lys Glu Ile Thr Gly Gly Lys
195 200 205
Lys Val Arg Val Val Tyr Asp Ser Val Gly Arg Asp Thr Trp Glu Arg
210 215 220
Ser Leu Asp Cys Leu Gln Arg Arg Gly Leu Met Val Ser Phe Gly Asn
225 230 235 240
Ser Ser Gly Ala Val Thr Gly Val Asn Leu Gly Ile Leu Asn Gln Lys
245 250 255
Gly Ser Leu Tyr Val Thr Arg Pro Ser Leu Gln Gly Tyr Ile Thr Thr
260 265 270
Arg Glu Glu Leu Thr Glu Ala Ser Asn Glu Leu Phe Ser Leu Ile Ala
275 280 285

Ser Gly Val Ile Lys Val Asp Val Ala Glu Gln Gln Lys Tyr Pro Leu
290 295 300

Lys Asp Ala Gln Arg Ala His Glu Ile Leu Glu Ser Arg Ala Thr Gln
305 310 315 320

Gly Ser Ser Leu Leu Ile Pro
325

<210> 7

<211> 334

<212> PRT

<213> *saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

Met Lys Cys Thr Ile Pro Glu Gln Gln Lys Val Ile Leu Ile Asp Glu
1 5 10 15
Ile Gly Gly Tyr Asp Val Ile Lys Tyr Glu Asp Tyr Pro Val Pro Ser
20 25 30
Ile Ser Glu Glu Glu Leu Leu Ile Lys Asn Lys Tyr Thr Gly Val Asn
35 40 45
Tyr Ile Glu Ser Tyr Phe Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Cys Glu Lys Pro
50 55 60
Tyr Val Leu Gly Arg Glu Ala Ser Gly Thr Val Val Ala Lys Gly Lys
65 70 75 80
Gly Val Thr Asn Phe Glu Val Gly Asp Gln Val Ala Tyr Ile Ser Asn
85 90 95
Ser Thr Phe Ala Gln Tyr Ser Lys Ile Ser Ser Gln Gly Pro Val Met
100 105 110
Lys Leu Pro Lys Gly Thr Ser Asp Glu Glu Leu Lys Leu Tyr Ala Ala
115 120 125
Gly Leu Leu Gln Val Leu Thr Ala Leu Ser Phe Thr Asn Glu Ala Tyr
130 135 140
His Val Lys Lys Gly Asp Tyr Val Leu Leu Phe Ala Ala Ala Gly Gly
145 150 155 160
Val Gly Leu Ile Leu Asn Gln Leu Leu Lys Met Lys Gly Ala His Thr
165 170 175
Ile Ala Val Ala Ser Thr Asp Glu Lys Leu Lys Ile Ala Lys Glu Tyr
180 185 190

Gly Ala Glu Tyr Leu Ile Asn Ala Ser Lys Glu Asp Ile Leu Arg Gln
195 200 205
Val Leu Lys Phe Thr Asn Gly Lys Gly Val Asp Ala Ser Phe Asp Ser
210 215 220
Val Gly Lys Asp Thr Phe Glu Ile Ser Leu Ala Ala Leu Lys Arg Lys
225 230 235 240
Gly Val Phe Val Ser Phe Gly Asn Ala Ser Gly Leu Ile Pro Pro Phe
245 250 255
Ser Ile Thr Arg Leu Ser Pro Lys Asn Ile Thr Leu Val Arg Pro Gln
260 265 270
Leu Tyr Gly Tyr Ile Ala Asp Pro Glu Glu Trp Lys Tyr Tyr Ser Asp
275 280 285
Glu Phe Phe Gly Leu Val Asn Ser Lys Lys Leu Asn Ile Lys Ile Tyr
290 295 300
Lys Thr Tyr Pro Leu Arg Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Asp Ile Glu
305 310 315 320
Ser Arg Lys Thr Val Gly Lys Leu Val Leu Glu Ile Pro Gln
325 330

<210> 8

<211> 329

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<400> 8

Met Ala Thr Gly Gln Lys Leu Met Arg Ala Ile Arg Val Phe Glu Phe
1 5 10 15
Gly Gly Pro Glu Val Leu Lys Val Gln Ser Asp Val Ala Val Pro Ile
20 25 30
Pro Lys Asp His Gln Val Leu Ile Lys Val His Ala Cys Gly Ile Asn
35 40 45
Pro Val Glu Thr Tyr Ile Arg Ser Gly Thr Tyr Thr Arg Ile Pro Leu
50 55 60
Leu Pro Tyr Thr Pro Gly Thr Asp Val Ala Gly Val Val Glu Ser Ile
65 70 75 80
Gly Asn Asp Val Ser Ala Phe Lys Lys Gly Asp Arg Val Phe Thr Thr
85 90 95

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Tyr Ala Glu Tyr Ala Leu Ala Ser Asp His
100 105 110
Thr Val Tyr Arg Leu Pro Glu Lys Leu Asp Phe Arg Gln Gly Ala Ala
115 120 125
Ile Gly Ile Pro Tyr Phe Thr Ala Cys Arg Ala Leu Phe His Ser Ala
130 135 140
Arg Ala Lys Ala Gly Glu Ser Val Leu Val His Gly Ala Ser Gly Gly
145 150 155 160
Val Gly Leu Ala Ala Cys Gln Ile Ala Arg Ala Tyr Gly Leu Lys Val
165 170 175
Leu Gly Thr Ala Gly Thr Glu Glu Gly Gln Lys Val Val Leu Gln Asn
180 185 190
Gly Ala His Glu Val Phe Asn His Arg Asp Ala His Tyr Ile Asp Glu
195 200 205
Ile Lys Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gly Val Asp Val Ile Ile Glu Met
210 215 220
Leu Ala Asn Val Asn Leu Ser Asn Asp Leu Lys Leu Leu Ser Cys Gly
225 230 235 240
Gly Arg Val Ile Ile Val Gly Cys Arg Gly Ser Ile Glu Ile Asn Pro
245 250 255
Arg Asp Thr Met Ala Lys Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Ser Leu Phe
260 265 270
Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Gln Gln Phe Ala Ser Thr Ile Gln Ala
275 280 285
Gly Met Glu Leu Gly Trp Val Lys Pro Val Ile Gly Ser Gln Tyr Pro
290 295 300
Leu Glu Lys Ala Ser Gln Ala His Glu Asn Ile Ile His Ser Ser Gly
305 310 315 320
Thr Val Gly Lys Thr Val Leu Leu Met
325

<210> 9

<211> 331

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Ala Thr Gly Gln Lys Leu Met Arg Ala Ile Arg Val Phe Glu Phe
1 5 10 15
Gly Gly Pro Glu Val Leu Lys Leu Gln Ser Asp Val Val Val Pro Val
20 25 30
Pro Gln Ser His Gln Val Leu Ile Lys Val His Ala Cys Gly Val Asn
35 40 45
Pro Val Glu Thr Tyr Ile Arg Ser Gly Ala Tyr Ser Arg Lys Pro Ala
50 55 60
Leu Pro Tyr Thr Pro Gly Ser Asp Val Ala Gly Ile Ile Glu Ser Val
65 70 75 80
Gly Asp Lys Val Ser Ala Phe Lys Lys Gly Asp Arg Val Phe Cys Tyr
85 90 95
Ser Thr Val Ser Gly Gly Tyr Ala Glu Phe Ala Leu Ala Ala Asp Asp
100 105 110
Thr Ile Tyr Pro Leu Pro Glu Thr Leu Asn Phe Arg Gln Gly Ala Ala
115 120 125
Leu Gly Ile Pro Tyr Phe Thr Ala Cys Arg Ala Leu Phe His Ser Ala
130 135 140
Arg Ala Arg Ala Gly Glu Ser Val Leu Val His Gly Ala Ser Gly Gly
145 150 155 160
Val Gly Leu Ala Thr Cys Gln Ile Ala Arg Ala His Gly Leu Lys Val
165 170 175
Leu Gly Thr Ala Gly Ser Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Leu Gln Asn
180 185 190
Gly Ala His Glu Val Phe Asn His Lys Glu Ala Asn Tyr Ile Asp Lys
195 200 205
Ile Lys Met Ser Val Gly Asp Lys Asp Lys Gly Val Asp Val Ile Ile
210 215 220
Glu Met Leu Ala Asn Glu Asn Leu Ser Asn Asp Leu Lys Leu Leu Ser
225 230 235 240
His Gly Gly Arg Val Val Val Val Gly Cys Arg Gly Pro Ile Glu Ile
245 250 255
Asn Pro Arg Asp Thr Met Ala Lys Glu Thr Ser Ile Ile Gly Val Ser
260 265 270
Leu Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Gln Gln Phe Ala Gly Leu Leu
275 280 285
Gln Ala Gly Ile Glu Lys Gly Trp Val Lys Pro Val Ile Gly Ser Glu
290 295 300

Tyr Pro Leu Glu Lys Ala Ala Gln Ala His Glu Asp Ile Ile His Gly
305 310 315 320

Ser Gly Lys Thr Gly Lys Met Ile Leu Leu Leu
325 330

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 10

tcacatatgg ctggaaaact caatgcac

28.

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 11

arggatccaa cgctcttatg gctcgac

27

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 12

cctctcgaga tggctggaaa actcatgcac

30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 13
caacccatgg atggctcgac aatgatcttc

30

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 14
cggttgtcga catgaagagt aatgaggttt gccth

35

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 15
gaatggtcga catgtttctg ccccgcaagt tc

32

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 16

ggttgtcgac atgctaggtg gaggtggact tg

32

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 17

cctctcgaga tggctggaaa aactcatgca c

31

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce PCR

<400> 18

acccatggct agatggctaa gaaccgctac

30

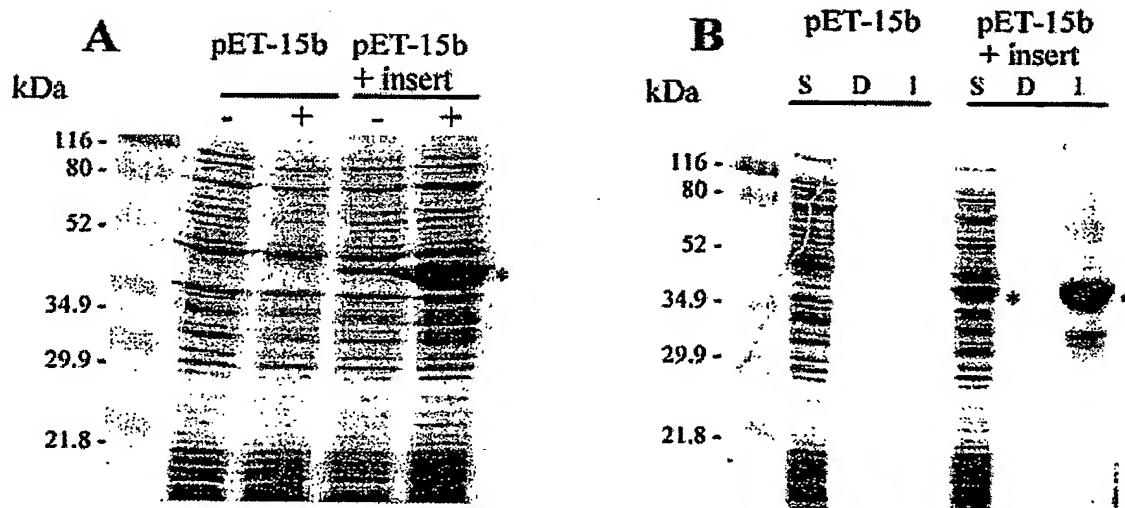


Fig . 1

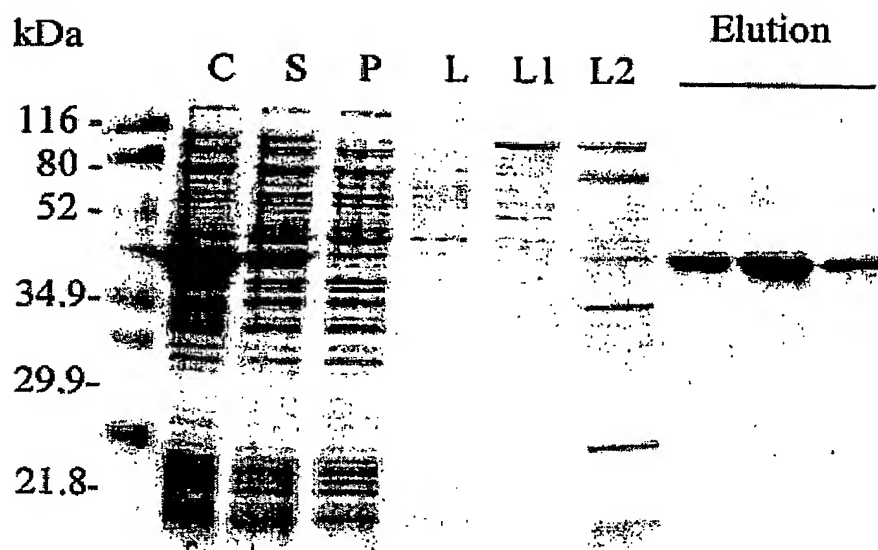
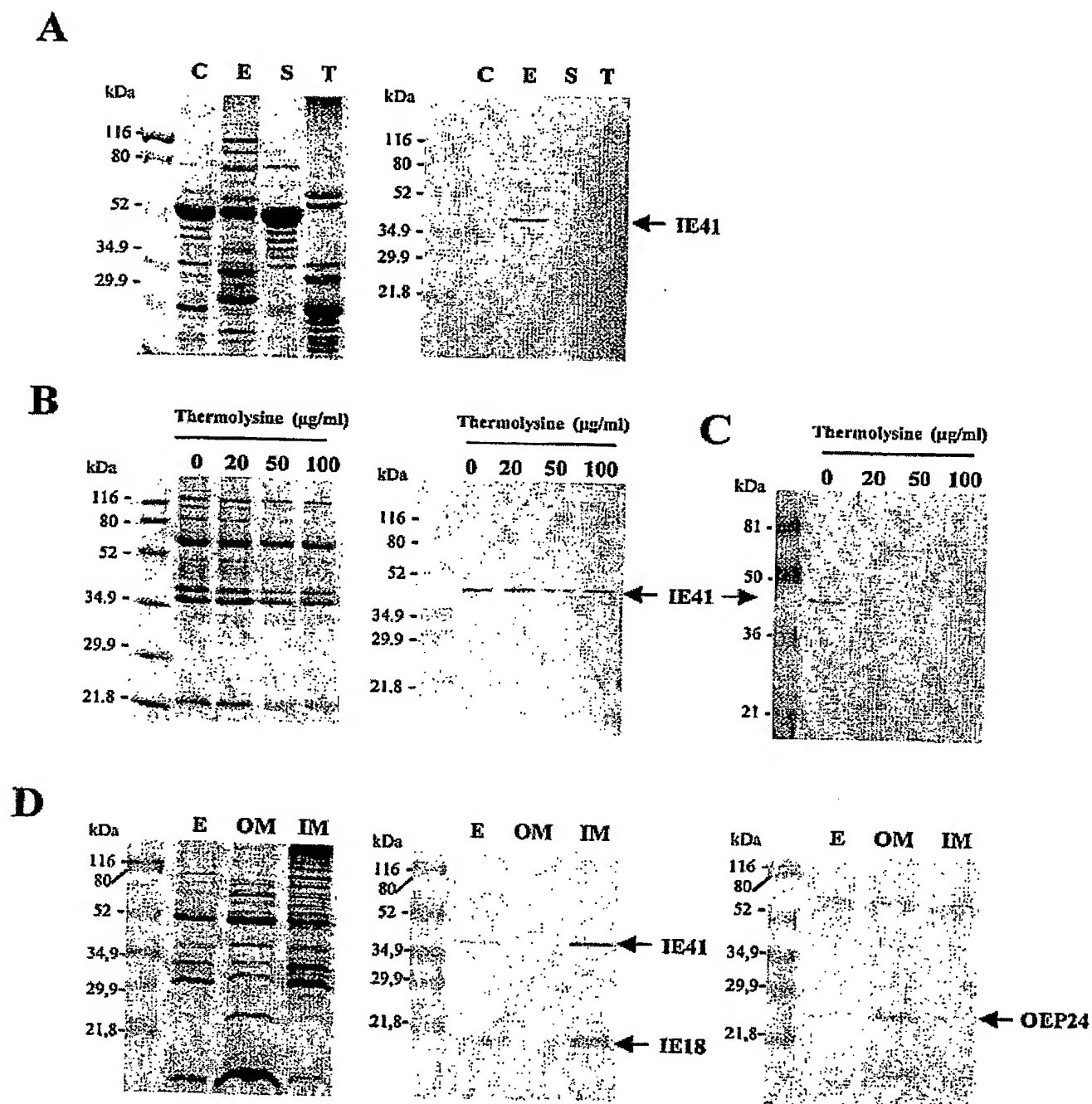


Fig . 2



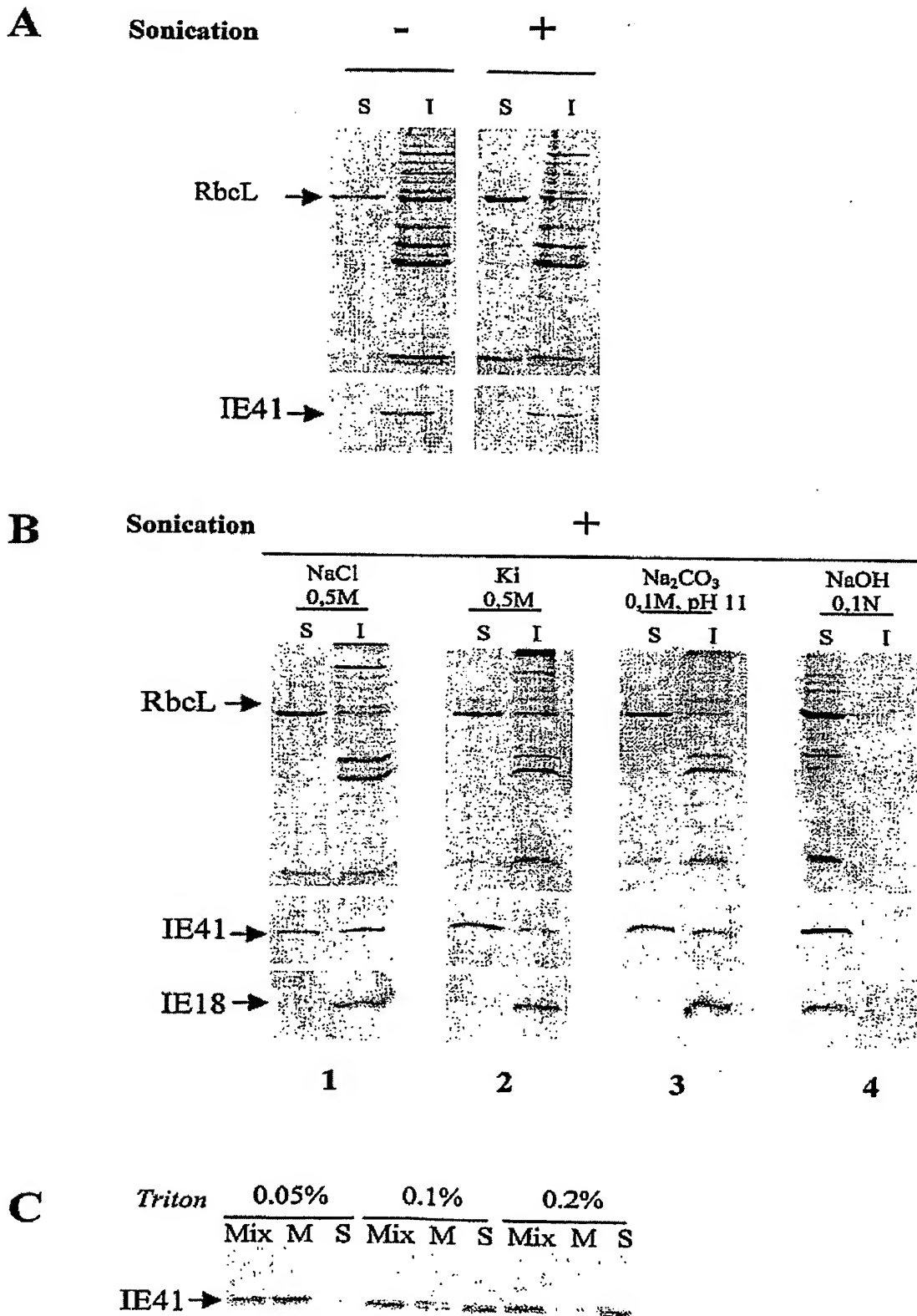


Fig . 4

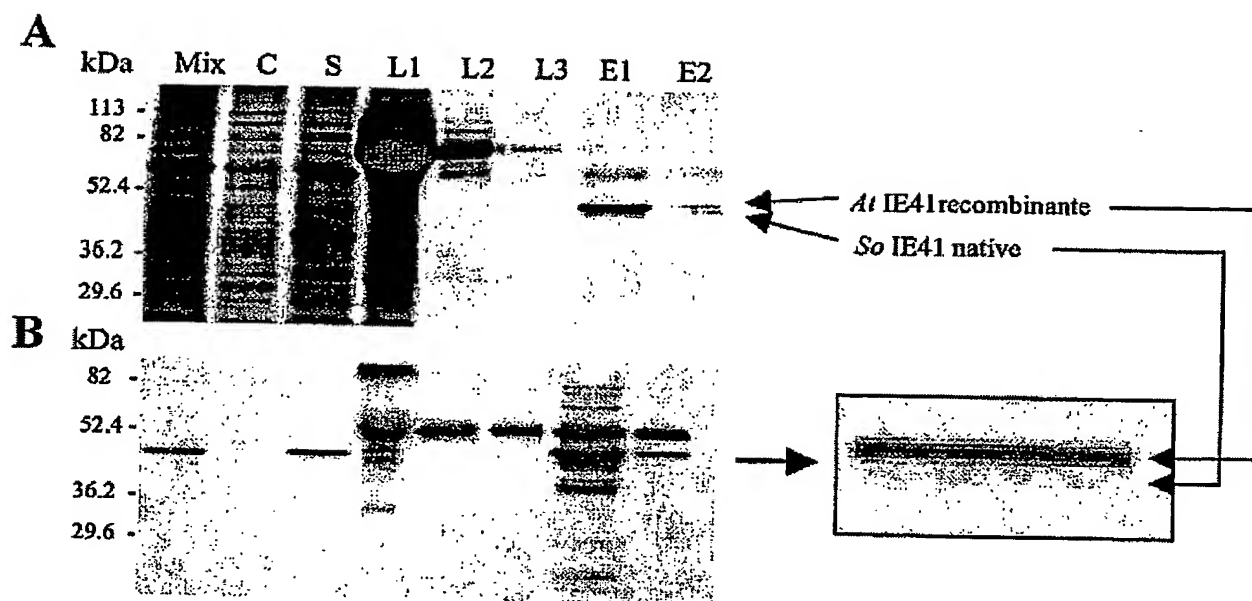


Fig . 5

ccatcctaata 8
 cgactcactatagggctcgagcggccgcccgggcagggtcaaactgtggtaagataataca 68
 gtaccattaccatctgacgcgcaaatggctgctaagctaattgcatgcatgattcaatattct 128
 M A A K L M H A I O Y S 12
 ggctatgggtgggtggaactgatgctttaaagcatgttgaagttgctgttctctgatccaaag 188
 G Y G G G T D A L K H V E V A V P D F K 32
 tctgatgagttattgctttaaattgaggctgcaactttgaacccaattgattggaagatt 248
 S D E L L L K I E A A T L N F I D W K I 52
 cagaagggtgtacttcgtccctcttaccocgcaagttccctactataacctggaactgat 308
 Q K G V L R P D L P R K F P T I P G T D 72
 gttgctggggagggtagtcacaggctggatctgctgtaaataggtttaaaactgggtgacaaa 368
 V A G E V V Q A G S A V N R F K T G D K 92
 gtcgtggccgtgcttagtcatgctactgggggtgcaactagctgaatatgccgtggcggaag 428
 V V A V L S H A T G G A L A E Y A V A K 112
 gagaacctgacagttgctagaccaccagaagtatcagcagcagaagggtgctgccttacct 488
 E N L T V A R P P E V S A A E G A A L P 132
 gttgctgccctcacggctcaccaagctctcaccagtttgccaacatcaagctcgatgga 548
 V A A L T A H Q A L T Q F A N I K L D G 152
 agtggtgaaaggaagaacatattgatcacggctgcatcaggggggtgtgggccactatgcg 608
 S G E R K N I L L T A A S G G V G H Y A 172
 gtccagctggcgaagctcggaacacgcgatgtaacagcaacatgtggagcccgcgaacct 668
 V O L A R L G N T H V T A T C G A R N L 192
 gatttcgtgaaaggcttgggtgccgatgaggttcttgactacaaaacacctgaaggggcg 728
 D F V K G L G A D E V I D Y K T P E G A 212
 tccttgacaagcccgctcaggaaagaaatatgactacgtagtcacaggtgcaagcgggaatc 788
 S L T S P S G K K Y D Y V V H G A S G I 232
 ccttgggtccacctttgagcccaatttgagtgaagcaggtgaaggtaatagatttgactcct 848
 P W S T F E P N L S E A G K V I D L T P 252
 ggcccaactgcaatgatgacatttgcttggaaaaagctaacattctccaaaaagcagctg 908
 G P T A M M T F A W K K L T F S K K Q I 272
 gtgcctctgcttttgataccaaagatccccaactttgaatatgttgtgaatttggtaaag 968
 V P L L L L L R K I P N F E Y V V N L V K 292
 gaaaagaagcttaaaacagtcatagactctaaacatcccttgagtaaaagggtgaagatgct 1028
 E K K L K T V I D S K H P L S K G E D A 312
 tggagtaggataatgggtggtcatgctacaggggaagattataatcgagccttgaatagaa 1088
 W S R I M G G H A T G K I I I E P * 329
 aatattgatgcagaccgctatatattgcttgaaggttacaaacttttaagtttatagta 1148
 cttgagttatactttcctagttgtaaacattcaagtatttcataatgttatactttccta 1208
 gtttctccaaaaaaa 1225

Fig. 6

QORECOLI ---EFHKHSE---VVOAV---FPEDEAENE---QENKAI---
 QORYEAST MKC IPEQQVVLIDEIGY---VVKYE---SYV SISEEE---LTKNYT---
 QORCAVPO ---GQIMFA---RVFEFG---VVKVQS---VVEIEKDHO---LHVHAC---
 QORMOUSE ---GQIMFA---RVFEFG---VVKVQS---VVEIEKDHO---LHVHAC---
 IE41 ATH ---MHAQYNSYGG---AAG---EHV---QVQVTEKSNE---CLLEAT---
 IE41 SOL ---MHAQYSGYGG---AAG---EHV---QVQVTEKSNE---CLLEAT---

QORECOLI TYRS---L---Y---PSL---SGL---EAG---G---SKVSG---KHIA---G---V---Y---SAL
 QORYEAST SYFR---G---Y---CEK---YVLGR---A---T---VAKK---G---TNEVE---Q---AYL---NSBF
 QORCAVPO TY---RSGTY---RI---LLYTP---G---V---ESI---ND---SARK---G---FT---SIS
 QORMOUSE TY---RSGAY---RKE---ALYTP---G---V---ESI---ND---SARK---G---FCYS---VS
 IE41 ATH WK---OKMIR---ELRKF---CIP---E---V---E---V---E---KNEKA---G---VAVL---HLGG
 IE41 SOL WK---OKMIR---ELRKF---CIP---E---V---E---V---E---KNEKA---G---VAVL---HLGG

QORECOLI ---SVHNIIADK---AILP---A---S---F---Q---S---K---L---V---Y---L---R---K---Y---E---
 QORYEAST ---OY---KI---S---Q---G---M---K---L---E---K---G---T---S---D---E---L---K---L---Y---P---G---L---O---V---E---L---A---L---S---F---T---N---E---Y---H---V---
 QORCAVPO ---S---Y---E---Y---A---L---A---S---D---H------V---Y---R---L---E------K---L------F---R---O---S---A---I---G---E---Y---E---T---A---C---R---A---F---H---S---A---R---A---
 QORMOUSE ---S---Y---E---Y---A---L---A---S---D---H------V---Y---R---L---E------K---L------F---R---O---S---A---I---G---E---Y---E---T---A---C---R---A---F---H---S---A---R---A---
 IE41 ATH ---S---L---A---S---F---A---V---A---T---E---K---L------K---R---P---O---E---V---G---A---A------S---A---L---P---A---G---L---A---L---O---A---T---N---E---A---G---L---L---D---
 IE41 SOL ---S---L---A---S---F---A---V---A---T---E---K---L------K---R---P---O---E---V---G---A---A------S---A---L---P---A---G---L---A---L---O---A---T---N---E---A---G---L---L---D---

QORECOLI ---D---F---F---H---A---G---G---G---L---I---C---W---A---K---A---L---G---A---K---I---G---V---S---A---Q---A---Q---S---A---L---K---A---G---W---O---
 QORYEAST ---K---E---Y---F---A---A---G---G---G---L---I---L---N---O---L---M---K---G---A---T---I---V---A---S---D---E---K---I---A---K---E---Y---A---E---Y---
 QORCAVPO ---S---H---A---S---G---G---L---A---C---O---P---A---Y---G---L---O---L---A---S---E---E---G---Q---K---V---L---Q---N---A---H---E---
 QORMOUSE ---S---H---A---S---G---G---L---A---C---O---P---A---Y---G---L---O---L---A---S---E---E---G---K---K---L---V---L---Q---N---A---H---E---
 IE41 ATH G---K---K---A---N---A---T---A---S---G---G---H---Y---V---S---A---L---A---N---A---T---A---C---S---A---R---N---I---E---F---V---K---S---L---D---E---
 IE41 SOL G---K---K---A---N---A---T---A---S---G---G---H---Y---V---S---A---L---A---N---A---T---A---C---S---A---R---N---I---E---F---V---K---S---L---D---E---

QORECOLI ---I---N---Y---E---E---D---L---V---E---R---K---E---I---T---G---K---V---R---V---Y---D---S---V---R---D---E---W---E---R---S---L---D---C---O---R---R---E---L---S---F---E---N---
 QORYEAST ---I---N---A---S---K---E---D---I---L---R---Q---V---L---K---F---T---N---G---G---V---S---F---D---S---V---K---D---T---E---I---S---L---A---A---K---R---K---V---E---S---F---E---N---
 QORCAVPO ---F---N---H---D---A---H---Y---I---D---E---K---K---S---I---E---K---G---V---V---I---E---M---L---N---N---L---S---N---D---L---K---L---S---C---C---R---I---V---E---
 QORMOUSE ---F---N---H---E---A---N---Y---I---D---K---K---M---S---V---D---A---D---K---G---V---V---I---E---M---L---N---N---L---S---N---D---L---K---L---S---H---G---R---V---V---E---
 IE41 ATH ---L---D---Y---T---E---E---G---A---A---K---S---P---S---G---K---Y---A---V---H---C---A---N---G---I---P---F---S---V---F---E---E---N---S---E---N---S---K---A---D---I---P---
 IE41 SOL ---L---D---Y---T---E---E---G---A---A---K---S---P---S---G---K---Y---A---V---H---C---A---N---G---I---P---F---S---V---F---E---E---N---S---E---N---S---K---A---D---I---P---

QORECOLI ---S---S---T---G---V---N---L---G---I---L---N---O---K---G---S---L---Y---V---T---R---P---S---L---O---Y---T---T---E---R---E---L---T---E---A---S---N---E---F---S---L---A---S---G---V---
 QORYEAST ---A---S---L---P---P---E---I---T---L---N---I---T---L---V---R---P---O---Y---Y---I---A---D---E---W---K---Y---S---D---E---F---F---G---L---N---S---K---
 QORCAVPO ---C---R---E---I---N---D---I---M---A---E---S---T---I---S---G---V---S---F---S---E---F---Q---Q---A---S---T---I---O---A---G---E---L---G---W---
 QORMOUSE ---C---R---E---I---N---D---I---M---A---E---S---T---I---S---G---V---S---S---S---E---F---Q---Q---A---G---L---O---A---G---E---K---G---W---
 IE41 ATH ---G---P---N---W---T---Y---V---K---I---M---K---O---V---E---L---L---I---P---A---N---L---E---M---N---L---K---E---G---K---
 IE41 SOL ---G---P---N---W---T---Y---V---K---I---M---K---O---V---E---L---L---I---P---A---N---L---E---M---N---L---K---E---G---K---

QORECOLI ---V---D---A---E---Q---Q---Y---E---K---D---Q---R---H---E---I---E---S---R---A---T---O---G---S---S---I---I---P---
 QORYEAST ---L---N---K---I---Y---K---T---Y---R---D---Y---R---T---A---A---D---E---E---R---K---I---V---G---L---V---E---I---P---O---
 QORCAVPO ---P---V---G---S---Q---Y---E---K---S---O---H---E---N---I---H---S---G---I---V---E---T---I---L---M---
 QORMOUSE ---P---V---G---S---E---Y---E---K---S---O---H---E---D---I---H---S---G---K---T---E---M---I---L---L---
 IE41 ATH ---T---V---D---S---K---H---S---K---E---D---A---W---A---K---S---D---H---A---G---I---E---P---
 IE41 SOL ---T---V---D---S---K---H---S---K---E---D---A---W---S---R---I---G---H---A---G---I---E---P---

Fig. 7

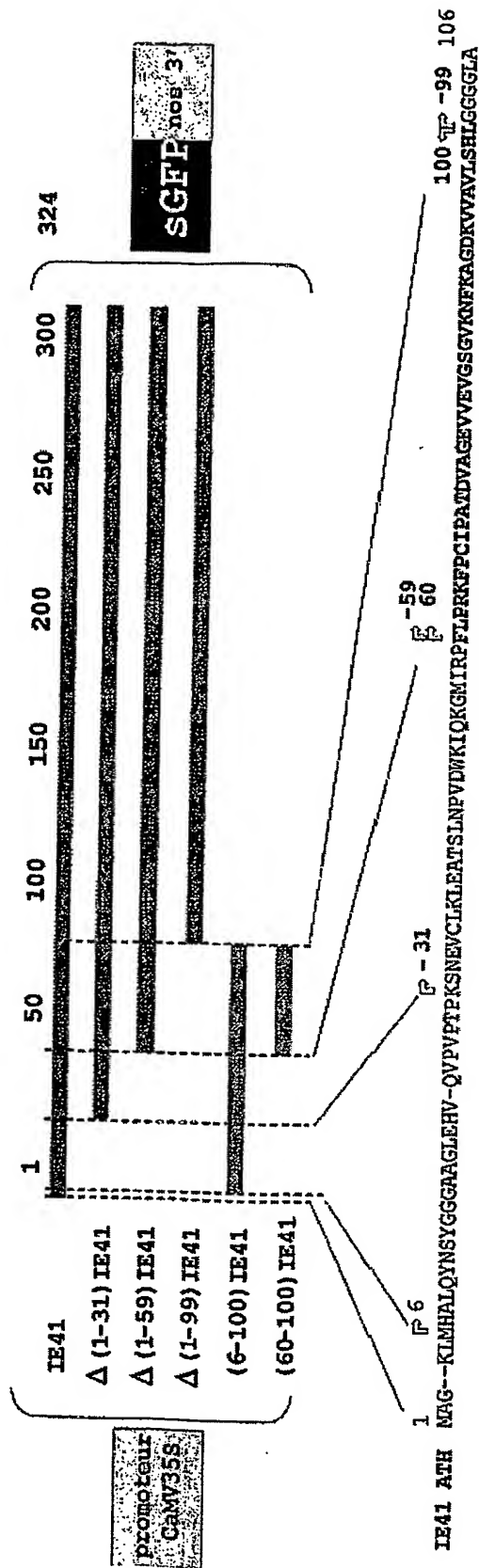
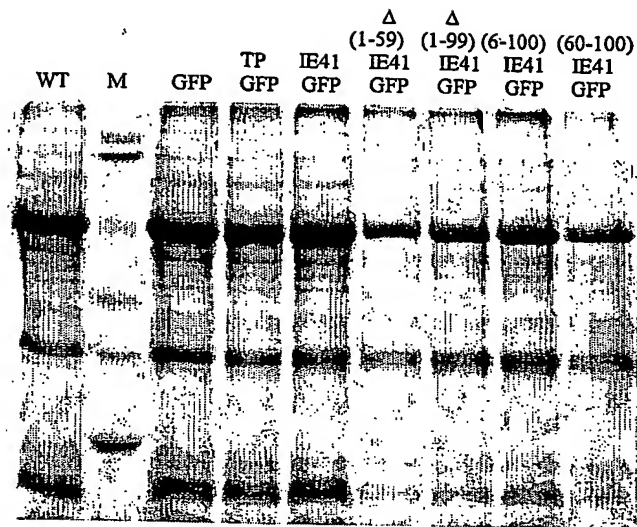
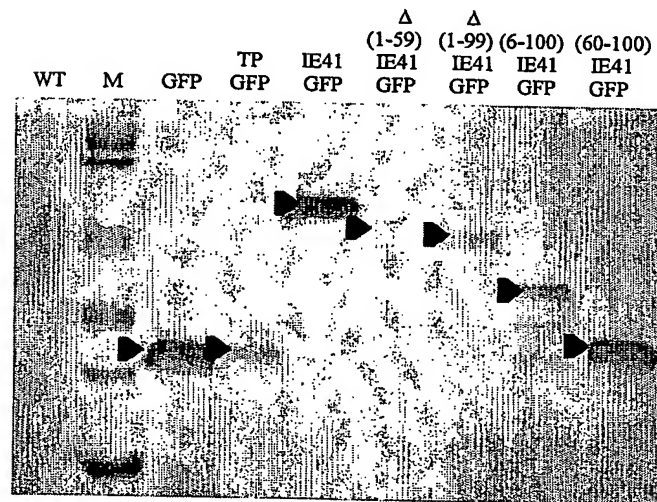


Fig . 8

A



B



C

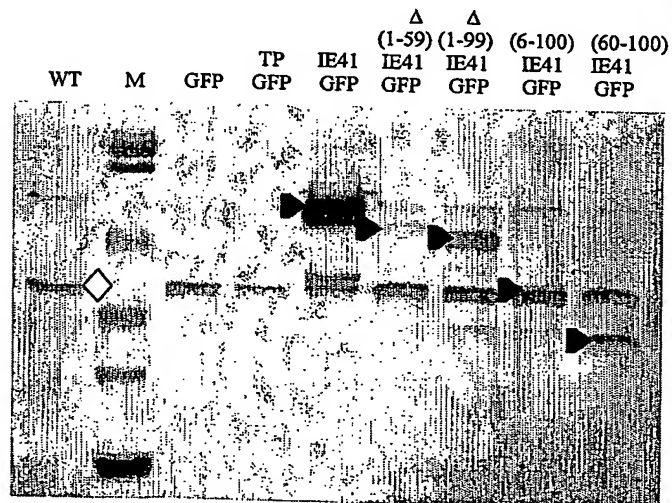


Fig. 9

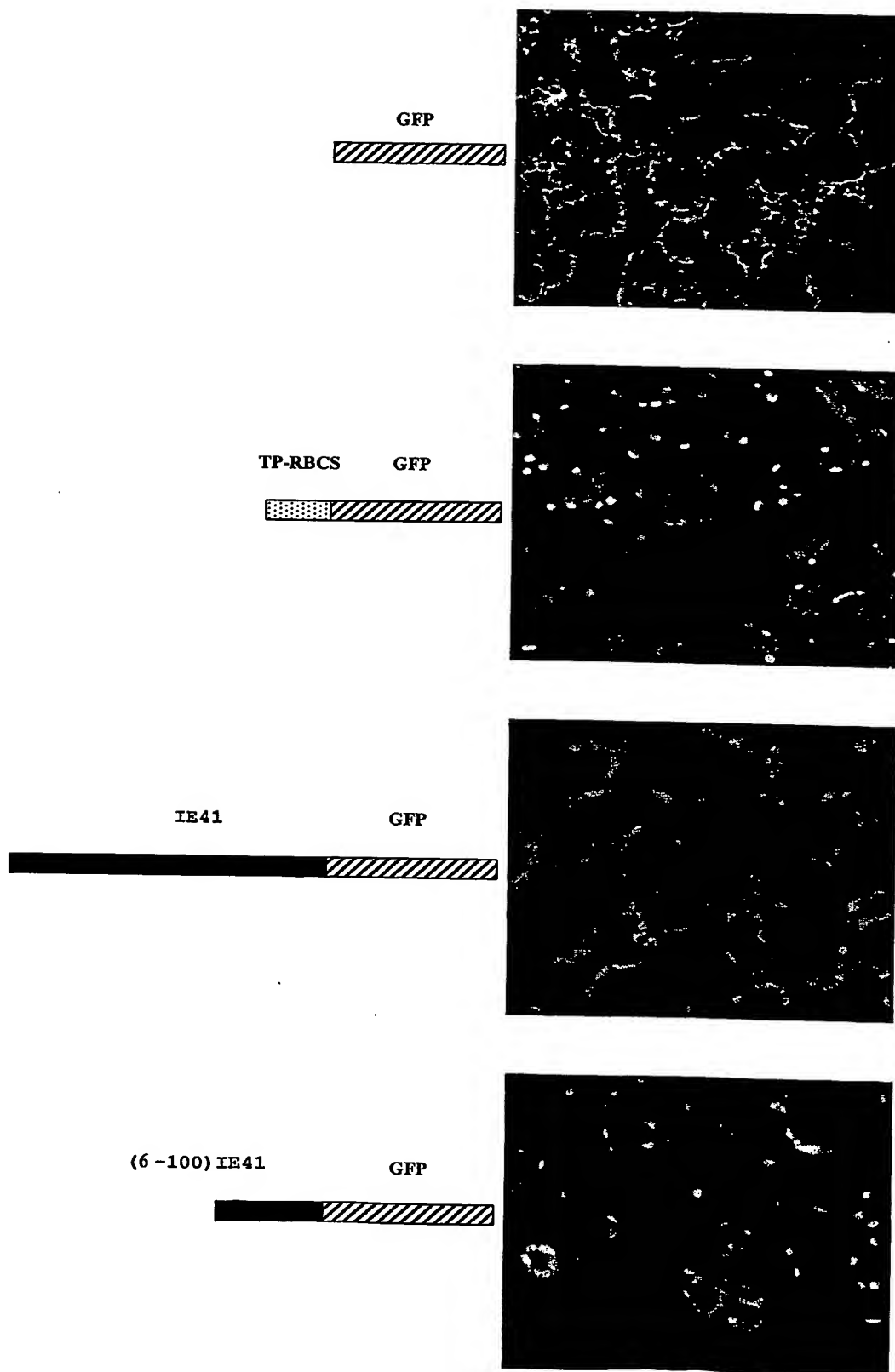


Fig . 10

Rec'd PCTO 17 DEC 2004

PCT/FR2003/001877

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/517309



Translation

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJPbv1516/7	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR2003/001877	International filing date (day/month/year) 19 juin 2003 (19.06.2003)	Priority date (day/month/year) 21 juin 2002 (21.06.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 9/02, 15/62		
Applicant GENOPLANTE-VALOR		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
 These annexes consist of a total of _____ sheets.
- This report contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 janvier 2004 (12.01.2004)	Date of completion of this report 18 August 2004 (18.08.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR2003/001877

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-31 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-12 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/10-10/10 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 03/01877

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-8, 12	YES
	Claims	1-3, 9-11	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents

D1: MIRAS STEPHANE ET AL: JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 49, 6 December 2002 (2002-12-06), pages 47770-47778

D2: SEIGNEURIN-BERNY DAPHNE ET AL: PLANT JOURNAL, vol. 19, no. 2, July 1999 (1999-07), pages 217-228

D3: DATABASE SWALL [online] 1 May 2000 (2000-05-01)
EVAN M. ET AL: "Putative zinc-binding dehydrogenase from Arabidopsis" retrieved from EBI, accession no. Q9SV68 Database accession no. Q9SV68

D4: WO 02 10210 A (BAYER AG (DE)) 7 February 2002 (2002-02-07)

D5: DATABASE WPI Section Ch, Week 200046 Derwent Publications Ltd, London, GB; Class C06, AN 2000-507395 & EP 1 033 405 A 6 September 2000 (2000-09-06)

2. Novelty (PCT Article 33(2)):

2.1. Document D1, which describes the subject matter of the present invention, has not been taken into consideration in the assessment of novelty, since it is assumed that the priority of the present application is justified (see also EPO Official Journal, 11/2001, pages 539-542, in particular point 13).

2.2. Document D2 describes the isolation of spinach IE41 protein (see page 222, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 2 and page 223, figure 4), which is the subject matter of the present invention (see examples 3 and 4).

The subject matter of claims 1-3 also covers the whole protein.

It should be noted that determining the amino acid sequence of this protein known from D2 does not confer novelty thereto.

Consequently, D2 is detrimental to the novelty of the subject matter of claims 1-3.

2.3. Documents D3 (see abstract), D4 (see SEQ ID No 2125) and D5 (see SEQ ID No 49545, 49546 and 49547) describe nucleotide sequences that exhibit 100% identity with the nucleotide sequence SEQ ID No 1.

Since claims 1-3 cover the whole protein, D3 to D5 also take away the novelty of the subject matter of claims 1-3 and 9-11.

2.4. The objections raised in points 2.2-2.3 above could be overcome by limiting the nucleotide/amino acid sequence of claims 1-3 to that of the fragment of

the IE41 protein responsible for intraplastid
addressing.

- 2.5. Claims filed as per point 2.4 above could be
considered inventive under the terms of an invention
relating to a selection.

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/PEA/416)	
Demande internationale No. PCT/FR 03/01877	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19.06.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 21.06.2002
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant GENOPLANTE-VALOR		



- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- I ☒ Base de l'opinion
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 12.01.2004	Date d'achèvement du présent rapport 18.08.2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets - Giltshiner Str. 103 D-10958 Berlin Tél. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	Fonctionnaire autorisé De Kok, A N° de téléphone +49 30 25901-314 

PCT/FR 03/01877

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° **PCT/FR 03/01877**

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration Nouveauté	Oui:	Revendications	4-8, 12
	Non:	Revendications	1-3, 9-11
Activité inventive	Oui:	Revendications	
	Non:	Revendications	1-12
Possibilité d'application industrielle	Oui:	Revendications	1-12
	Non:	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 33 quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: MIRAS STEPHANE ET AL: JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 49, 6 décembre 2002 (2002-12-06), pages 47770-47778,
- D2: SEIGNEURIN-BERNY DAPHNE ET AL: PLANT JOURNAL, vol. 19, no. 2, juillet 1999 (1999-07), pages 217-228,
- D3: DATABASE SWALL [en ligne] 1 mai 2000 (2000-05-01) EVAN, M. ET AL.: 'Putative zinc-binding dehydrogenase from Arabidopsis' retrieved from EBI, accession no. Q9SV68 Database accession no. Q9SV68,
- D4: WO 02 10210 A (BAYER AG (DE)) 7 février 2002 (2002-02-07) ,
- D5: DATABASE WPI Section Ch, Week 200046 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 2000-507395 & EP 1 033 405 A 6 septembre 2000 (2000-09-06).

2. **Nouveauté (Article 33(2) du PCT):**

- 2.1 Le document D1, qui décrit l'objet de la présente invention, n'a pas été considéré pour l'évaluation de la nouveauté parce qu'il est supposé que la priorité de la présente demande est justifiée (voir aussi Journal Officiel OEB, 11/2001, page 539-542, particulièrement le point 13).
- 2.2 Le document D2 décrit l'isolation de la protéine IE41 de l'espinard (voir page 222, colonne 1, alinéa 1 - colonne 2, alinéa 2 et page 223, figure 4), qui est l'objet de la présente invention (voir exemples 3 et 4).
L'objet des revendications 1 à 3 s'étend aussi à la protéine complète.
Il est à souligné, que la détermination de la séquence acide aminé de cette protéine connue de D2 ne la rend pas nouvelle.
En conséquence, D2 détruit la nouveauté de l'objet des revendications 1 à 3.
- 2.3 Les documents D3 (voir abrégé), D4 (voir SEQ.ID.No.2125) et D5 (voir SEQ.ID.No's 49545, 49546 et 49547) décrivent des séquences nucléotidiques comportant 100 % d'identité avec la séquence nucléotidique de SEQ.ID.No. 1.

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR 03/01877

Parce que la portée des revendications 1 à 3 s'étend à la protéine complète, D3 à D5 détruisent aussi la nouveauté de l'objet des revendications 1 à 3 et 9 à 11.

- 2.4 Les objections soulevées aux points 2.2 -2.3 peuvent être surmontées en limitant la séquence nucléotidique/acide aminé des revendications 1 à 3 à celle du fragment de la protéine IE41 responsable de l'adressage intraplastidial.
- 2.5 Des revendications à déposer selon le point 2.4 pourraient être considérées comme impliquant une activité inventive au titre d'une invention de sélection.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01877 10/517309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOISIS, EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, PAJ, CAB Data, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MIRAS STEPHANE ET AL: "Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 49, 6 December 2002 (2002-12-06), pages 47770-47778, XP002233838 ISSN: 0021-9258 the whole document -/-	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2003

Date of mailing of the international search report

29/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR/01877

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SEIGNEURIN-BERNY DAPHNE ET AL: "Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: A subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins." PLANT JOURNAL, vol. 19, no. 2, July 1999 (1999-07), pages 217-228, XP002233839 ISSN: 0960-7412 cited in the application page 222, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 2; figure 4</p>	1-12
A	<p>WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7 April 1988 (1988-04-07) the whole document</p>	1-12
A	<p>DATABASE SWALL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) EVAN, M. ET AL.: "Putative zinc-binding dehydrogenase from Arabidopsis" retrieved from EBI, accession no. Q9SV68 Database accession no. Q9SV68 XP002233840 100 % d'identité avec le polypeptide seq.id.no.1 abstract</p>	1-3
A	<p>WO 02 10210 A (BAYER AG (DE)) 7 February 2002 (2002-02-07) seq.id.2125 100% d'identité avec le polypeptide seq.id.no.1 page 39</p>	1-3
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200046 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 2000-507395 XP002233841 seq.id.no's 49545,49546,49547 100% d'identité avec seq.id.no.1 et seq.id.no's 1330,1331,1332 99,6% d'identité avec seq.id.no.1 abstract & EP 1 033 405 A 6 September 2000 (2000-09-06)</p>	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP/01877

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8802402	A	07-04-1988	AU 620317 B2	20-02-1992
			AU 8079787 A	21-04-1988
			EP 0285646 A1	12-10-1988
			JP 1501038 T	13-04-1989
			WO 8802402 A1	07-04-1988
WO 0210210	A	07-02-2002	WO 0210210 A2	07-02-2002
			AU 8984301 A	13-02-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/01877

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, PAJ, CAB Data, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	MIRAS STEPHANE ET AL: "Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 49, 6 décembre 2002 (2002-12-06), pages 47770-47778, XP002233838 ISSN: 0021-9258 le document en entier --- -/--	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 octobre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/10/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PC177FR 03/01877

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SEIGNEURIN-BERNY DAPHNE ET AL: "Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: A subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins." PLANT JOURNAL, vol. 19, no. 2, juillet 1999 (1999-07), pages 217-228, XP002233839 ISSN: 0960-7412 cité dans la demande page 222, colonne 1, alinéa 1 -colonne 2, alinéa 2; figure 4</p>	1-12
A	<p>WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7 avril 1988 (1988-04-07) le document en entier</p>	1-12
A	<p>DATABASE SWALL 'en ligne! 1 mai 2000 (2000-05-01) EVAN, M. ET AL.: "Putative zinc-binding dehydrogenase from Arabidopsis" retrieved from EBI, accession no. Q9SV68 Database accession no. Q9SV68 XP002233840 100 % d'identité avec le polypeptide seq.id.no.1 abrégé</p>	1-3
A	<p>WO 02 10210 A (BAYER AG (DE)) 7 février 2002 (2002-02-07) seq.id.2125 100% d'identité avec le polypeptide seq.id.no.1 page 39</p>	1-3
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200046 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 2000-507395 XP002233841 seq.id.no's 49545,49546,49547 100% d'identité avec seq.id.no.1 et seq.id.no's 1330,1331,1332 99,6% d'identité avec seq.id.no.1 abrégé & EP 1 033 405 A 6 septembre 2000 (2000-09-06)</p>	1-3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

aux familles de brevets

Demande internationale No. . .

PCT/FR 03/01877

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8802402	A	07-04-1988	
		AU 620317 B2	20-02-1992
		AU 8079787 A	21-04-1988
		EP 0285646 A1	12-10-1988
		JP 1501038 T	13-04-1989
		WO 8802402 A1	07-04-1988
WO 0210210	A	07-02-2002	
		WO 0210210 A2	07-02-2002
		AU 8984301 A	13-02-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.